

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV Innenstadt –
Diabetes Zentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Analyse der Subtypen und Aktivitätsmuster dendritischer
Zellen im peripheren Blut bei Patienten mit Typ 1 Diabetes**



Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christina Tremel

aus

Heidelberg

2013

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jochen Seißler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Oliver Schnell

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 11.07.2013

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Abbildungsverzeichnis.....	4
Tabellenverzeichnis.....	6
Abkürzungsverzeichnis.....	7
1 Einleitung	1
1.1 Diabetes mellitus	1
1.1.1 Typ 2 Diabetes.....	2
1.1.2 Typ 1 Diabetes.....	5
1.2 Immunsystem	8
1.2.1 Das angeborene Immunsystem	9
1.2.2 Das erworbene Immunsystem.....	11
1.3 Dendritische Zellen.....	12
1.3.1 Klassifikation dendritischer Zellen und ihrer Subpopulationen.....	12
1.3.2 Die Funktion dendritischer Zellen.....	13
1.3.3 Die Rolle der dendritischen Zellen bei Autoimmunerkrankungen	14
1.3.4 Dendritische Zellen und Diabetes mellitus.....	15
2 Fragestellung der Arbeit.....	18
3 Material und Methoden	19
3.1 Material	19
3.1.1 Reagenzien.....	19
3.1.2 Antikörper	20
3.1.3 Medien und Puffer.....	22
3.1.4 Geräte.....	22
3.1.5 Verbrauchsmaterial.....	23
3.1.6 Patientenauswahl.....	24

3.1.7	Entnahme und Verarbeitung der verwendeten Blutproben.....	25
3.1.8	Gewinnung humaner dendritischer Zellen aus Vollblut	25
3.1.9	Kulturbedingungen der Monozyten und Generierung von humanen dendritischen Zellen	27
3.1.10	Analyse der Oberflächenantigene dendritischer Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS)	30
3.1.11	Quantifizierung verschiedener DC-Subpopulationen im peripheren Blut mittels Dendritic Cell Enumeration Kit.....	33
3.1.12	Dot-Plot-Beispiele für die Auswertung des Blood Dendritic Cell Enumeration Kits	35
3.1.13	Durchführung eines TLR-Stimulations-Assays.....	38
3.1.14	Messung von Zytokinen und Chemokinen im Zellkulturüberstand mittels ELISA	39
3.2	Statistische Analyse	41
3.2.1	Verwendete Hypothesen	42
3.2.2	Empirische Fragestellung	43
4	Ergebnisse	44
4.1	Messung der DC-Subpopulationen im Vollblut mittels Enumeration Kit (DC-EK)	44
4.2	Analyse der dendritischen Zellen nach Kultivierung (FACS-Daten)	50
4.2.1	Analyse der Reinheit der DC-Population durch FACS	50
4.2.2	Bestimmung der Expressionsstärke der Oberflächenantigene.....	54
4.3	Sekretion von Zytokinen und Chemokinen im Vollblut-Assay	56
5	Diskussion	67
5.1	Prävalenz der DC Subpopulationen im peripheren Blut.....	67
5.2	<i>Ex vivo</i> Untersuchung der Aktivität des angeborenen Immunsystems.....	71
5.3	Limitationen des Studiendesigns.....	74
5.4	Ausblick	75
6	Zusammenfassung.....	76

7	Literaturverzeichnis	77
8	Danksagung	86
	Anhang	87

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einflussfaktoren der Entstehung eines Typ 2 Diabetes (Graphik nach Pickup und Williams 1997)	4
Abbildung 2: Therapieschema bei Diabetes mellitus Typ 2.....	5
Abbildung 3: Übersicht der Bestandteile des Immunsystems.....	9
Abbildung 4: Interaktion des erworbenen und angeborenen Immunsystems bei der Entstehung des Typ 1 Diabetes.....	17
Abbildung 5: Übersicht der Blutaufbereitung und des Untersuchungsschemas	25
Abbildung 6: Isolierung von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut mit Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation	26
Abbildung 7: Zellverteilung im Dot-Plot FSC gegen SSC.....	33
Abbildung 8: Mittelwerte der DC-Subpopulationen in den verschiedenen Patientengruppen und der Kontrollgruppe gemessen mittels DC-EK....	45
Abbildung 9: Zellzahl der myeloiden dendritischen Zellen Typ 1 (MDC1) pro ml Blut in den verschiedenen Gruppen.....	46
Abbildung 10: Zellzahl der myeloiden dendritischen Zellen Typ 2 (MDC2) pro ml Blut in den verschiedenen Gruppen.....	47
Abbildung 11: Zellzahl der plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDC) pro ml Blut in den verschiedenen Gruppen.....	47
Abbildung 12: Anteil der myeloiden dendritischen Zellen Typ 1 (MDC1) in Prozent [%] der absoluten Leukozytenzahl	48
Abbildung 13: Anteil der myeloiden dendritischen Zellen Typ 2 (MDC2) in Prozent [%] der absoluten Leukozytenzahl	49
Abbildung 14: Anteil der plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDC) in Prozent [%] der absoluten Leukozytenzahl	49
Abbildung 15: Expressionsraten spezifischer Oberflächenmarker der kultivierten dendritischen Zellen am Beispiel eines Typ 1 Diabetikers	51
Abbildung 16: Beispiel für den Nachweis von Oberflächenmarkern in der FACS-Analyse von den in Zellkultur isolierten dendritischen Zellen.	52
Abbildung 17: Prävalenz DC-spezifischer Marker nach <i>in vitro</i> Kultivierung (Prozent der Gesamtzellen)	53

Abbildung 18: Mean Fluorescence Intensity DC-spezifischer Marker nach <i>in vitro</i> Kultivierung	55
Abbildung 19: Zeitverlauf der Sekretion von IL-6 im Vollblutassay nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden	57
Abbildung 20: IL-6-Sekretion im Vollblutassay nach Stimulation mit verschiedenen TLR.....	58
Abbildung 21: Zeitverlauf der Sekretion von TNF- α im Vollblutassay nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden	59
Abbildung 22: TNF- α -Sekretion im Vollblutassay nach Stimulation mit verschiedenen TLR.....	60
Abbildung 23: Zeitverlauf der Sekretion von IL-12p70 im Vollblutassay nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden	61
Abbildung 24: IL-12p70-Sekretion im Vollblutassay nach Stimulation mit verschiedenen TLR.....	62
Abbildung 25: IL-10-Sekretion mononukleärer Zellen nach Stimulation mit verschiedenen Stimulantien nach Abzug der RPMI- Stimulationswerte als Negativkontrolle	63
Abbildung 26: Mittlere IL-10-Konzentration im Zeit- und Gruppenvergleich.....	64
Abbildung 27: Zeitverlauf der Sekretion von CCL-18 im Vollblutassay nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden	65
Abbildung 28: Mittlere CCL-18-Konzentration im Zeit- und Gruppenvergleich.....	66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der Diabetesformen nach den Leitlinien der DDG und der ADA ...	2
Tabelle 2: Anthropometrische und klinische Daten der untersuchten Personengruppen.....	24
Tabelle 3: Phänotyp der DC-Subpopulationen.....	32
Tabelle 4: Literaturwerte für DC-Subpopulationen im DC-EK laut Hersteller.....	35
Tabelle 5: Verwendete Stimulantien des Vollblut-Assay	38
Tabelle 6: Funktion verschiedener Toll-like Rezeptoren (TLR)	39
Tabelle 7: Gruppenvergleich der Mittelwerte der DC-Subpopulationen in den verschiedenen Patientengruppen und der Kontrollgruppe gemessen mit dem DC-EK	45
Tabelle 8: Isolierung dendritischer Zellen in der Zellkultur.	54
Tabelle 9: Auflistung der Mean Fluorescence Intensity DC-spezifischer Marker nach <i>in vitro</i> Kultivierung	55

Abkürzungsverzeichnis

ADA	Amerikanische Diabetes Gesellschaft (American Diabetes Association)
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
BDCA	Blood Dendritic Cell Antigen
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD	Cluster of Differentiation
(h) DC	(humane) Dendritische Zellen (Dendritic cells)
DC-EK	Dendritic Cell Enumeration Kit
DDG	Deutsche Diabetes Gesellschaft
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Ethylenediaminetetraacetic acid)
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
g	Erdschwerebeschleunigung ($\sim 9,81 \text{ m/s}^2$)
GDM	Gestationsdiabetes
hABS	humanes AB-Serum
hGM-CSF	human granulocyte macrophage colony-stimulating-factor

HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
IAPP	Inselamyloidpolypeptid
IFN	Interferon
IL	Interleukin
KONT	Kontrollen
LPS	Lipopolysaccharid
IgG	Immunglobulin G
MCH	Mittleres korpuskuläres Hämoglobin (Mean corpuscular hemoglobin)
MCHC	Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (Mean corpuscular hemoglobin concentration)
MCV	Mittleres korpuskuläres Volumen (Mean corpuscular volume)
MDC1	Myeloide dendritische Zellen Typ 1
MDC2	Myeloide dendritische Zellen Typ 2
MHC	Hapthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex)
MW	Mittelwert
N	Anzahl (number)
NKT	Natürliche Killer T-Zellen
nm	Nanometer
NOD	Non-obese diabetic
OD	Optische Dichte
oGTT	Oraler Glukose-Toleranz-Test
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (Pathogen-associated molecular pattern)
PBMC	Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (Peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate buffered saline)
PDC	Plasmazytoide dendritische Zellen

PE	Phycoerythrin
PECy5	Phycoerythrin-Cyanin 5
PIC	Polyinosinic:polycytidylic acid (Poly I:C)
PRR	Mustererkennungsrezeptor (Pattern recognition receptor)
P/S	Penicillin/Streptomycin
RD	Reagenzverdünnungsmittel (Reagent Diluent)
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
Rpm	Revolutions per minute
RT	Raumtemperatur (+22°C)
SD	Standardabweichung (Standard deviation)
SEM	Standardfehler (Standard error of the mean)
SSC	Seitwärtsstreulicht (Side scatter)
ssDNA	Einzelstrang-DNA (Single-stranded)
ssRNA	Einzelstrang-RNA (Single-stranded)
SSW	Schwangerschaftswoche
T1DM	Typ 1 Diabetes mellitus
T2DM	Typ 2 Diabetes mellitus
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
T _H	T-Helferzelle
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (Toll-like receptor)
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
T _{reg}	Regulatorische T-Zellen
U	Einheiten (Units)
W	Watt
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation)
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus (griechisch: honigsüßer Durchfluss) ist eine Stoffwechselstörung, die durch chronische Hyperglykämie und inadäquate Metabolisierung von Glukose gekennzeichnet ist. Charakteristische Symptome sind Polyurie, Polydipsie und Gewichtsverlust. Die Hyperglykämie ist Folge einer gestörten Insulinsekretion, verminderter Insulinwirkung im Zielgewebe (sogenannte Insulinresistenz) oder einer Kombination beider Mechanismen (Pickup 1997b; Capeau 2008). Das Hormon Insulin wird in den Zellen des Pankreas produziert, in den Insulingranula als Hexamer gespeichert und glukoseabhängig sezerniert (Pickup 1997b). An den peripheren Organen (z.B. Skelettmuskel, Leber, Fettgewebe) bewirkt Insulin eine Erhöhung der Glukose- und Aminosäureaufnahme sowie eine Steigerung der Glykogen-, der Protein- und der Lipidsynthese. Katabole Stoffwechselprozesse wie Lipolyse und Glykogenolyse werden durch Insulin supprimiert.

Essentiell für die Langzeitprognose von Diabetikern ist, unabhängig von der Genese der Erkrankung, das Auftreten diabetesassoziierter Erkrankungen. Diese können das Auge (diabetische Retinopathie), die Nieren (diabetische Nephropathie), das Nervensystem (sensomotorische und autonome Neuropathie) sowie die großen Gefäße (Atherosklerose mit Risiko für Myokardinfarkt, Apoplex und periphere Verschlusskrankheit) betreffen. Diese gilt es zu vermeiden, rechtzeitig zu erkennen und zu therapieren (Pickup 1997b; van Dieren 2010). Regelmäßige Vorsorgeuntersuchungen zum Gefäßstatus, eine optimale Blutzuckereinstellung und die Behandlung weiterer kardiovaskulärer Risikofaktoren sind daher sehr wichtig.

Nach den Leitlinien der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) und der American Diabetes Association (ADA) werden verschiedene Diabetestypen anhand ihrer unterschiedlichen Pathogenese differenziert, wie in Tabelle 1 aufgeführt (Kerner 2005; American Diabetes Association 2010). Die häufigsten Diabetesformen stellen mit ca. 90% der Typ 2 Diabetes und mit ca. 10% der Typ 1 Diabetes dar. Diese werden in den folgenden Abschnitten näher erläutert (American Diabetes Association 2010).

❖ **Typ 1 Diabetes mellitus**

Charakteristisch hierfür ist die komplette β -Zellzerstörung, welche zu einem absoluten Insulinmangel führt (meist bedingt durch einen Autoimmunprozess)

❖ **Typ 2 Diabetes mellitus**

Charakteristisch hierfür sind inadäquate β -Zellfunktion und Insulinresistenz, welche in ihrer Kombination unterschiedlich ausgeprägt sein können

❖ **Andere spezifische Diabetestypen**

Beruhend auf verschiedenen genetischen Defekten, Erkrankungen des exokrinen Pankreas, Endokrinopathien, medikamentös-toxischer, infektiöser oder immunologischer Genese

❖ **Gestationsdiabetes**

Definiert als Störung der Glukosetoleranz, welche erstmals während der Schwangerschaft auftritt

Tabelle 1: Einteilung der Diabetesformen nach den Leitlinien der DDG und der ADA

1.1.1 Typ 2 Diabetes

Der Typ 2 Diabetes ist eine weit verbreitete Volks- und insbesondere Wohlstandskrankheit und stellt mit einem Anteil von ca. 90% die häufigste aller Formen des Diabetes mellitus dar (American Diabetes Association 2010). Der Typ 2 Diabetes manifestiert sich meistens im mittleren bis späten Lebensalter. Seine Bedeutung für Gesellschaft und Wirtschaft nimmt mit der progredienten Überalterung der Bevölkerung zu. Die Diabetesprävalenz ist von ca. 5% der Bevölkerung in den achtziger Jahren auf 8-10% in aktuellen Erhebungen angestiegen. Die genauen Zahlen variieren abhängig von der beobachteten Altersgruppe und der ethnischen Zugehörigkeit (Rathmann 2003; Scherbaum 2004). Nach den Schätzungen der WHO und der International Diabetes Federation wird sich die Prävalenz des Typ 2 Diabetes weltweit bis zum Jahr 2030 verdoppeln (Federation 2009).

Neben den bereits unter 1.1 beschriebenen körperlichen Schäden sind auch die volkswirtschaftlichen Folgen beachtlich. Hauner veröffentlichte 2006 jährliche Ausgaben von 60 Milliarden Euro für die rund sechs Millionen Diabetiker in Deutschland. Dabei entfallen fast 75 % der Kosten auf indirekte Posten. Hierbei sind nicht nur die steigenden Therapiekosten, sondern auch der Ausfall der Arbeitskraft und dessen Auswirkungen zu beachten (Hauner 2005; American Diabetes Association 2008; van Dieren 2010).

Ursächlich für die Entstehung eines Typ 2 Diabetes ist das Zusammenspiel von genetischer Prädisposition und Umweltfaktoren. Hauptrisikofaktoren sind laut WHO und ADA Bewegungsmangel, Adipositas (insbesondere Stammfettsucht), Fettüberladung mit Dyslipidämie und essentielle Hypertonie (American Diabetes Association 2010; WHO 2010). Multiple Genpolymorphismen wurden in den letzten Jahren bei Typ 2 Diabetikern identifiziert, die mit Insulinresistenz, β -Zellfunktion, Adipositas oder Regulation der Glukosekonzentration assoziiert sind (Loos 2008; Zeggini 2008; Saxena 2010; Voight 2010). Bei einem Teil der Genvarianten ist deren Funktion noch unbekannt.

Häufiger Vorreiter des Typ 2 Diabetes ist das metabolische Syndrom. Hierbei handelt es sich um einen Komplex bestehend aus viszeraler Adipositas, Dyslipidämie, Hypertension und Glukosetoleranzstörung, der mit einem hohen Atheroskleroserisiko verbunden ist (Eckel 2005; Cornier 2008; Alberti 2009). Bei Menschen mit metabolischem Syndrom oder alleiniger Adipositas/ Dyslipidämie entwickelt sich eine Insulinresistenz, d.h. die peripheren Organe wie Muskulatur, Leber, Fettgewebe aber auch das Gehirn sprechen auf Insulin mit einer verminderten Glukoseaufnahme, verminderter Proteinsynthese und gesteigerter Lipolyse an (DeFronzo 1985; Groop 1989; Abdul-Ghani 2010; Patti 2010). In der Folge wird von den β -Zellen versucht vermehrt Insulin zu produzieren, um diesen Effekt zu kompensieren (Ferrannini 2005). Der chronische Hyperinsulinismus verstärkt wiederum die Insulinresistenz (Pessin 2000). Bei über Jahre bestehender Insulinresistenz kommt bei vielen Menschen der Punkt, an dem die β -Zellen die Kompensation nicht mehr aufrechterhalten können und eine zunehmende Störung der β -Zellfunktion zu verzeichnen ist. Diese beruht einerseits auf einer chronischen Insulinsekretionsüberlastung und andererseits auf direkter toxischer Wirkung der Hyperglykämie und Hyperlipidämie (freie Fettsäuren), die zu vermehrter Freisetzung von Sauerstoffradikalen, einer zellulären Stressreaktion im endoplasmatischen Retikulum und Inflammation führt (Donath 2005; Samuel 2010). Im Rahmen der zellulären Stressreaktion ist u.a. die Proteinprozessierung gestört, so dass beispielsweise vermehrt Proinsulin sezerniert und Inselamyloidpolypeptid (IAPP) fehlerhaft gefaltet und in den Langerhans'schen Inseln abgelagert wird (Pflutzner 2004). Die IAPP-Ablagerungen sind toxisch und verstärken auf diese Weise den Verlust der β -Zellen (Ritzel 2007; Haataja 2008).

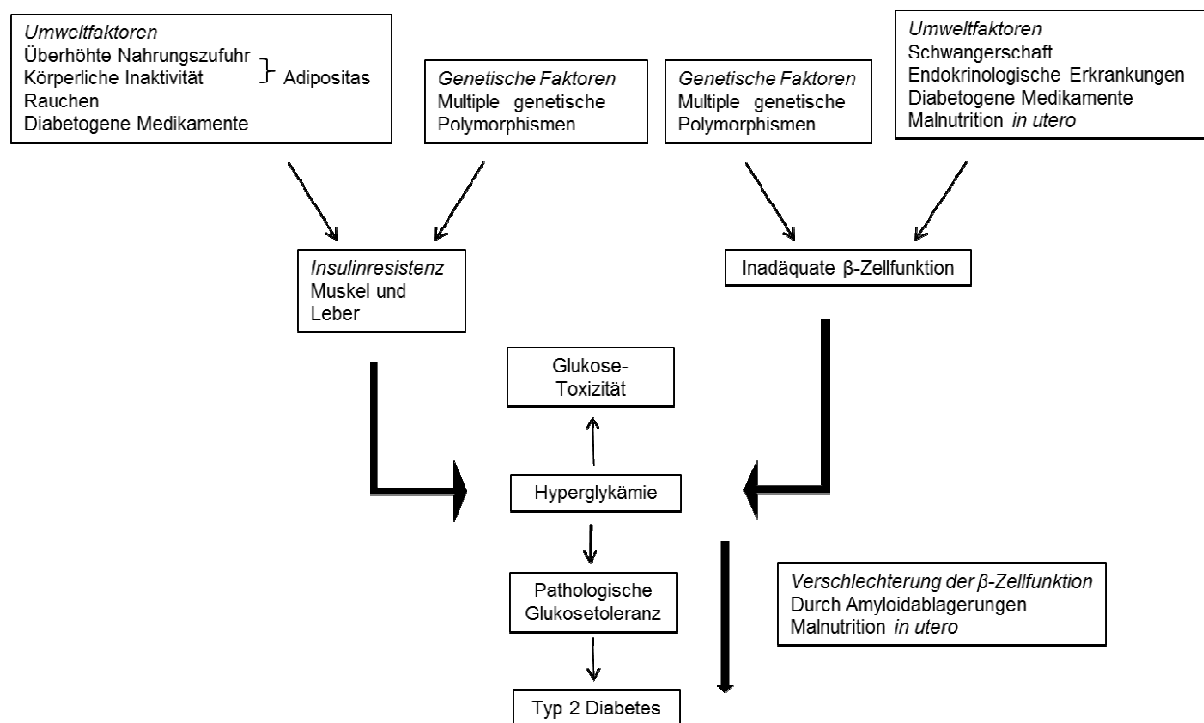


Abbildung 1: Einflussfaktoren der Entstehung eines Typ 2 Diabetes (Graphik nach Pickup und Williams 1997)

Bereits in der prädiabetischen Phase sowie im Stadium der pathologischen Insulinresistenz ist ein Verlust der ersten Phase der Insulinsekretion nachzuweisen (Ferrannini 2007). Wird der Kreislauf aus Zunahme der Insulinresistenz und chronischer Überlastung der β -Zellen nicht unterbrochen, entwickelt sich ein relativer Insulinmangel mit Hyperglykämie (Typ 2 Diabetes). Zum Zeitpunkt der Diabetesmanifestation ist die β -Zellmasse zu etwa 50-60% reduziert (Butler 2003; Saisho 2007). Nach der Diagnosestellung ist im Verlauf der Diabeteserkrankung auch häufig ein progredienter β -Zellverlust mit Entwicklung der Notwendigkeit einer Insulintherapie zu verzeichnen.

Ein weiterer pathogenetischer Mechanismus ist die bei Adipositas auftretende subklinische Inflammation. Insbesondere durch die bauchbetonte Adipositas mit erhöhtem viszeralen Fettgewebe werden eine Vielzahl von Hormonen (z.B. Leptin, Visfatin, Resistin, Adiponectin), Zytokinen (z.B. Tumor-Nekrose-Faktor- α [TNF- α], Interleukin [IL]-1 β , IL-6) und Chemokinen (z.B. MCP-1, MIF) produziert, die mit Ausnahme des Adiponectins überwiegend proinflammatorisch wirken (Deng 2010; Gelsinger 2010). Diese inflammatorischen Adipokine verstärken die Insulinresistenz der peripheren Organe und wirken zusätzlich direkt β -Zell-toxisch.

Therapeutisch wird bei Typ 2 Diabetes eine Änderung des Essverhaltens und eine Steigerung der körperlichen Aktivität anvisiert (Abbildung 2). Hierzu gehören eine gesunde Ernährung sowie ausreichende Bewegung und meist eine Gewichtsreduktion. Es konnte gezeigt werden, dass durch Lebensstilintervention die Entwicklung eines Typ 2 Diabetes bei Risikopersonen signifikant reduziert werden kann und sich die Insulinresistenz adipöser Typ 2 Diabetiker mindert, sobald sie abnehmen (Williams 2003; Lindstrom 2006; Knowler 2009). Wenn diese Basismaßnahmen nicht ausreichen, werden als weitere Schritte orale Antidiabetika wie Biguanide, Glitazone, Glinide, α -Glukosidase-Hemmer oder Sulfonylharnstoffe gegeben. Die letzte Stufe der Typ 2 Diabetes-Behandlung ist die Insulintherapie (Matthaei 2009).

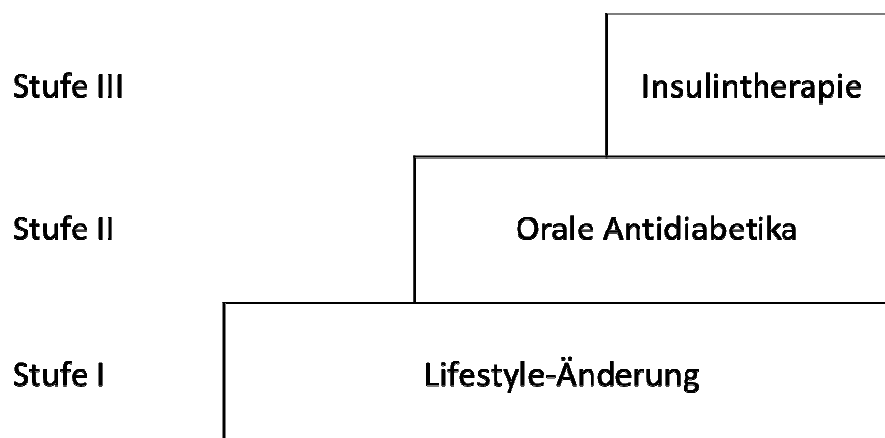


Abbildung 2: Therapieschema bei Diabetes mellitus Typ 2

1.1.2 Typ 1 Diabetes

Circa zehn Prozent aller Diabetiker leiden an einem Typ 1 Diabetes. Nach einer Analyse von Onkamo aus dem Jahre 1999 steigt die weltweite Inzidenz von Typ 1 Diabetes um 3 % jährlich (Onkamo 1999). Neu und Mitarbeiter publizierten 2001 einen Inzidenzanstieg des Typ 1 Diabetes von 3,6 % pro Jahr für Kinder in Baden-Württemberg (Neu 2001). Bei erneuter Evaluation dieser fortgeführten Studie im Jahre 2008 fanden Eehalt und Neu einen Inzidenzanstieg um 3,8 % jährlich (Eehalt 2008). Dies zeigt, dass Typ 1 Diabetes enorm an medizinischer und gesellschaftlicher Bedeutung gewinnt.

Typ 1 Diabetes ist eine Autoimmunerkrankung, welche aufgrund einer Abwehrreaktion des Immunsystems gegen die körpereigenen insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas entsteht. Autoreaktive T-Lymphozyten (CD4 und CD8 positive Lymphozyten) und antigenpräsentierenden Zellen (APZ) führen zu einer kompletten Zerstörung der β -Zellen mit

daraus resultierendem absoluten Insulinmangel. Typ 1 Diabetiker präsentieren sich klassischerweise mit Gewichtsverlust, Müdigkeit, Polydipsie, Polyurie und Nykturie. Die Symptome treten erst ab einem β -Zellverlust von 80-90 % auf. Manchmal werden diese Symptome nicht hinreichend wahrgenommen, sodass die Patienten erst bei Eintreten eines ketoazidotischen Komas diagnostiziert werden.

An der Entstehung eines Typ 1 Diabetes sind multiple Faktoren beteiligt (Eiselein 2004; van der Werf 2007). Für eine genetische Prädisposition spricht, dass ein Fünftel aller Typ 1 Diabetiker eine positive Familienanamnese aufweist. In einer finnischen Studie konnte gezeigt werden, dass eineiige Zwillinge mit einer Häufigkeit von 47 % an Typ 1 Diabetes erkranken im Vergleich zu zweieiigen Zwillingen mit einer Übereinstimmungsrate von 7 % (Hyttinen 2003). Ebenso konnte erhoben werden, dass Verwandte ersten Grades eine höhere Inzidenz für Typ 1 Diabetes haben im Vergleich zur Normalbevölkerung (Harjutsalo 2005). Wichtige Genloci sind Humane Leukozyten-Antigen-Allele (HLA-Allele), insbesondere der Klasse II mit HLA-DR3-DQ2 und/oder HLA-DR4-DQ8. Das Humane Leukozyten-Antigen-System entspricht dem Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) (Murphy 2009). Die HLA-DR3-DQ2/DR4-DQ8 Genotypen tragen zu mehr als 50% zur genetischen Prädisposition des Typ 1 Diabetes bei. Weitere mit Typ 1 Diabetes assoziierte Gene beinhalten unter anderem die Region des Insulingens auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 und das zytotoxische T-Lymphozyten Antigen 4 (CTLA-4). Eine aktuelle Übersicht über die genetische Prädisposition und neue Genpolymorphismen bei Typ 1 Diabetes ist in den Publikationen von Concannon sowie Steck und Rewers dargestellt (Pickup 1997b; Concannon 2009; Steck 2011)

Die kontinuierliche Zunahme der Inzidenz des Typ 1 Diabetes in den Industrienationen spricht für bisher noch nicht genau identifizierte Umweltfaktoren, welche die Pathogenese der Erkrankung entscheidend beeinflussen. Diskutiert werden hierbei die frühkindliche Ernährung mit Exposition gegenüber Kuhmilchproteinen, Getreide und Gluten, virale Infektionen, Vitamin D Mangel sowie chemische Toxine (Pickup 1997b; van der Werf 2007; Hypponen 2010). Neue Forschungsergebnisse zeigen mittels ernährungsabhängiger Ansätze, dass das Immunsystem des Darms Einfluss auf die Auslösung von Autoimmunität und die Entstehung des Typ 1 Diabetes hat (Åkerblom 2002). Bei Neugeborenen wurde eine Korrelation zwischen der Exposition gegenüber Kuhmilchproteinen oder Gluten in den ersten Lebensmonaten und einem erhöhtem Risiko für die Entwicklung eines Typ 1 Diabetes beschrieben (Ziegler 2003; Åkerblom 2005; Rosenbauer 2007; Hypponen 2010; Hummel 2011).

Auch Virusinfektionen tragen vermutlich zur Inselzellzerstörung bei. Van der Werf verglich 2007 Tiermodelle und in vitro Studien zu folgenden Virusinfektionen und ihrer Relevanz für Typ 1 Diabetes: Enteroviren (Coxsackie), Röteln, Mumps, Rotaviren, Parvovirus und Cytomegalievirus (CMV). Dabei wurde die Hypothese aufgestellt, dass Viren direkt mittels Zytolyse oder indirekt über Aktivierung autoreaktiver T-Zellen die β -Zell-Zerstörung induzieren. Jedoch wurde auch darauf hingewiesen, dass ein Beweis für einen kausalen Zusammenhang zwischen viraler Infektion und Typ 1 Diabetes beim Menschen noch aussteht (van der Werf 2007). Von Herrath postulierte 2009, dass virale Infektionen nur das Zünglein an der Waage sind, welche einer durch genetische Prädisposition bereits bestehenden Inselzellautoimmunität nach jahrelangem Latenzstadium zum Ausbruch verhelfen (von Herrath 2009). Neben einer direkten virusbedingten β -Zelllyse könnte durch ein „molekulares Mimikry“ eine Kreuzreaktion zwischen viralen und β -Zell-Antigenen mit konsekutiver autoimmuner β -Zellzerstörung auftreten (Jenson 1980; von Herrath 2003). Diese Theorien begründen sich auf Tierversuchen, vornehmlich mit Non-obese diabetic (NOD)-Mäusen. Erstmals 1980 von Makino beschrieben hat sich das NOD-Maus-Modell zum am meist genutzten Modell zur Erforschung des Typ 1 Diabetes entwickelt, da es viele Übereinstimmungen zur humanen Pathogenese zeigt. Im Alter von ca. 6 Wochen entwickeln die Tiere eine Infiltration der Langerhans'schen Inseln mit antigenpräsentierenden Zellen und Lymphozyten („Insulitis“). Es lassen sich autoreaktive CD4-positive und CD8-positive T-Lymphozyten, welche gegen Peptide von β -Zellproteinen gerichtet sind, sowie Autoantikörper (z.B. gegen Insulin) nachweisen und es folgt bei ca. 70-90 % der weiblichen NOD-Mäuse die Entwicklung eines Insulinmangel-Diabetes. Vergleichbar mit der Genese des Typ 1 Diabetes ist hierbei die T-Zell-vermittelte Insulitis, das Vorkommen von Autoantikörpern, die genetische Korrelation zu MHC-Molekülen und der Einfluss von Umweltfaktoren auf die Krankheitsentwicklung (Makino 1980; Leiter 1987; Järdane 2009).

Die Diagnose des Typ 1 Diabetes erfolgt über den Nachweis einer Hyperglykämie mittels Blutzuckermessung, der typischen klinischen Symptomatik und dem Nachweis von Autoantikörpern. Folgende Autoantikörper sind charakteristisch für den Typ 1 Diabetes: zytoplasmatische Inselzell-Antikörper, Insulinautoantikörper (IAA), Glutamatdecarboxylase-Antikörper (GADA), Autoantikörper gegen Tyrosin-Phosphatase IA-2 (IA-2-A), sowie Autoantikörper gegen den Zinktransporter ZnT8 (ZnT8-A) (Seissler 2006; Martin 2007; Eisenbarth 2008; Winter 2011). Der Typ 1 Diabetes muss aufgrund des absoluten Insulinmangels mit exogener Insulinzufuhr behandelt werden. Mittel der Wahl ist eine intensivierete Insulintherapie nach dem Basis-Bolus-Prinzip mit Injektion eines langwirksamen Basalinsulins 1-2 x pro Tag und eines schnellwirksamen Normal-

oder Analoginsulins zu den Hauptmahlzeiten (Martin 2003). Bei sehr aktiven Diabetikern oder schwer einstellbaren Patienten stellt die Insulinpumpentherapie eine sehr gute Alternative dar (Eiselein 2004; Nuboer 2008).

1.2 Immunsystem

Das Immunsystem dient der Erkennung und Abwehr von Krankheitserregern und Tumorzellen. Weitere wichtige Funktionen sind immunologische Gedächtnisbildung und Selbstregulation (Danilova 2006). Die Gedächtnisbildung ermöglicht dem Immunsystem bei erneuter Infektion mit einem bereits bekannten Pathogen schneller und präziser zu reagieren. Hierbei ist die Selbstregulation von entscheidender Bedeutung. Ist das Immunsystem nicht in der Lage seine Reaktion in gewissen Situationen zu drosseln, kann dies zur Entstehung von Allergien und Autoimmunerkrankungen führen (Yan 2010). Bei Allergien führt ein bei gesunder Immunitätslage harmloser Reiz zu einer inadäquaten überschießenden Immunantwort (Greten 2005). Bei Autoimmunerkrankungen erkennt, bzw. verkennt das Immunsystem körpereigene Strukturen als „nicht-körpereigen“ und beginnt diese zu bekämpfen (Lleo 2010). Wie in Abbildung 3 dargestellt unterscheidet man zum einen zwischen der zellulären und der humoralen Immunantwort, zum anderen zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem.

Alle zellulären Bestandteile des Immunsystems entstehen aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Aus ihnen entwickeln sich eine lymphatische und eine myeloische Zellreihe, aus denen sich alle weiteren Zellen bilden. Das humorale System setzt sich aus Plasmaproteinen verschiedener Klassen zusammen. Hierzu gehören Antikörper, das Komplementsystem und die Interleukine (Murphy 2009). Das Immunsystem basiert auf einem komplexen Zusammenspiel seiner Bestandteile, welches nun näher erläutert wird.

	<i>Unspezifisch</i>	<i>Spezifisch</i>
Zellulär	Phagozyten Granulozyten Mastzellen Killerzellen	T-Lymphozyten
Humoral	Komplementsystem	Antikörper

Abbildung 3: Übersicht der Bestandteile des Immunsystems

Einteilung der Zelltypen und Bestandteile des Immunsystems in ihre zugehörigen Gruppen

1.2.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene, sogenannte unspezifische Immunsystem besteht von Geburt an und bewirkt die Abwehr von Pathogenen und Tumorzellen. Es bleibt ein Leben lang unverändert und gewährt keine dauerhafte Immunität (Murphy 2009). Seine Aufgabe ist es abnorme Körperzellen und Krankheitserreger zu erkennen, Zellen des erworbenen Immunsystems zu aktivieren und den Krankheitsprozess primär so lange unter Kontrolle zu halten bis das adaptive Immunsystem einsatzbereit ist.

Zu den Zellen des nativen Immunsystems gehören Makrophagen, Monozyten, natürliche Killerzellen, dendritische Zellen und neutrophile Granulozyten (Iwasaki 2004). Die Wahrnehmung von Pathogenen erfolgt über einen Mustererkennungsrezeptor (pattern recognition receptor, PRR). Mustererkennungsrezeptoren erkennen molekulare Strukturen, die häufig auf Mikroorganismen, jedoch nicht auf körpereigenen Zellen vorkommen. Beispiele hierfür sind u.a. Lipopolysaccharide bakterieller Zellwände und Proteoglykane (Zak 2009). Mit Hilfe dieser molekularen Strukturen, sogenannte pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP), sind die Zellen des Immunsystems in der Lage „fremd“ von „selbst“ zu unterscheiden (Iwasaki 2004; Mogensen 2009).

Nach dem Erkennen körperfremder Strukturen werden vor allem von den antigenpräsentierenden Zellen (APZ), wie z.B. den Makrophagen und den dendritischen Zellen, Informationen an das spezifische Immunsystem weitergegeben. Die APZ nehmen Antigene aus der Umgebung und auch Pathogene über rezeptorvermittelte Phagozytose oder Makropinozytose auf, prozessieren diese und präsentieren sie auf ihren MHC-Molekülen (Murphy 2009). HLA sind die humane Version der MHC. HLA-Klasse-I umfasst HLA-A, -B, -C und HLA-Klasse-II HLA-DR, -DP, -DQ (Martin 2009). MHC-Klasse-II Moleküle präsentieren

vorwiegend Antigenpeptide, die aus dem Extrazellarraum stammen. MHC-Klasse-I-Moleküle präsentieren Antigenpeptide aus dem Zellinneren. Die dendritischen Zellen sind außerdem in der Lage exogene, von einer virusinfizierten Zelle freigesetzte Antigene über eine sogenannte Kreuzpräsentation auch auf MHC-I Molekülen zu präsentieren. Hierdurch wird die Brücke zum adaptiven Immunsystem geschlagen.

Eine wichtige Funktion im angeborenen Immunsystem übernehmen die Toll-ähnlichen-Rezeptoren (Toll-like receptor; TLR). Sie gehören zu den Mustererkennungsrezeptoren und beteiligen sich an der Erkennung pathogen-assoziierten molekularer Muster. Toll-ähnliche-Rezeptoren sind in der Lage biochemische Abwehrreaktionen in der Zelle gegenüber Krankheitserregern auszulösen. Dabei wird die Zytokinproduktion und -freisetzung der Zelle induziert und somit eine Immunantwort ausgelöst. Der Name „Toll-ähnliche-Rezeptoren“ ist auf eine Veröffentlichung von Christiane Nüsslein-Volhard aus dem Jahre 1980 zurückzuführen (Nüsslein-Volhard 1980). Da Toll-ähnliche-Rezeptoren auch in einfacheren Organismen wie *Drosophila melanogaster* gefunden wurden, besteht Grund zur Annahme, dass es sich hierbei um ein evolutionär gesehen sehr altes System handelt (Medzhitov 1997; Kawai 2006). Es gibt mehrere Toll-ähnliche-Rezeptoren. Beim Menschen wurden bisher zehn Varianten ausfindig gemacht. Sie werden unter anderem auf Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert. Jeder Toll-ähnliche-Rezeptor erkennt eine andere molekulare Struktur. TLR 1 erkennt triacetylierte Lipopeptide, TLR 2, 4, 5 und 6 erkennen bakterielle oder virale Lipopolysaccharide und Proteine, TLR 3, 7, 8 und 9 erkennen vor allem bakterielle und virale Nukleinsäuren (Iwasaki 2004; Kawai 2006). Welcher Ligand an TLR 10 bindet ist bisher noch unbekannt.

Körpereigene Gefahrenmoleküle sind Moleküle, die von Körperzellen nach Zellbeschädigung oder Destruktion freigesetzt werden. Hierunter fallen das Nukleotid Adenosintriphosphat (ATP), Adenosin, verschiedene Prostaglandinderivate (z.B. PGE₂, PGD₂) und in Körperzellen produzierte Zytokine (z.B. IL-1 β , Interferon- α , Interferon- β) (Medzhitov 2008; Murphy 2009; Commins 2010; De Winter 2010).

Durch dieses Erkennen von Signaturen, welche eine Gefährdung des Körpers darstellen, sind die Zellen des adaptiven Immunsystems in der Lage wichtige Informationen aus der Umgebung aufzunehmen und die notwendige Stärke der Aktivierung des erworbenen Immunsystems zu steuern.

1.2.2 Das erworbene Immunsystem

Die spezifische Immunantwort wird über das erworbene Immunsystem vermittelt. Hierbei handelt es sich um einen adaptiven Prozess. Das erworbene Immunsystem ist als Gedächtnis gegenüber Pathogenen tätig und ermöglicht so eine oft lebenslange Immunität z.B. bei erneuter Infektion mit einem bereits bekannten Pathogen. Bestandteile des adaptiven Immunsystems sind T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und die von den B-Zellen und Plasmazellen produzierten und sezernierten Antikörper (Immunglobuline) (Bonilla 2010). Durch Rekombination der für die Antikörperbildung verantwortlichen Gensegmente (V-, D- und J-Segmente) entstehen zahlreiche Möglichkeiten, um genau jene Antikörper herzustellen, welche spezifisch ein Antigenepitop erkennt und somit das aktuelle Pathogen bekämpfen können (Bassing 2002). Während einer Immunreaktion werden einige T- und B-Zellen zu Gedächtniszellen umgewandelt. Die Gedächtniszellen erkennen bei erneuter Infektion mit dem nun bekannten Pathogen sofort die entsprechende molekulare Struktur des Pathogens und induzieren eine schnellere Immunabwehr (Ahmed 1996).

Um primär die Immunabwehr in Gang zu setzen, müssen naive T-Zellen von antigenpräsentierenden Zellen aktiviert werden („priming“). Naive T-Zellen wandern permanent durch die peripheren lymphatischen Organe und suchen die Oberfläche von APZ nach Antigenepitopen ab. Konventionelle dendritische Zellen sind besonders effektiv dieses Priming durchzuführen (siehe Kapitel 1.3). Wenn naive T-Zellen auf eine Peptidbeladene antigenpräsentierende Zelle treffen, können diese, wenn sie mit ihrem T-Zellrezeptor das gleiche Antigen im Kontext von MHC und kostimulierenden Signalen erkennen, aktiviert und in T-Effektorzellen umgewandelt werden (Melief 2003).

Die Effektorzellen lassen sich in mehrere Typen einteilen. CD8-positive zytotoxische T-Zellen erkennen den MHC-Klasse-I-Peptidkomplex und können Körperzellen (z.B. eine virusinfizierte Zelle), welche dieses Peptid exprimieren, abtöten. CD4-positive T-Helferzellen (CD4-Th) können APZ und CD8-positive T-Lymphozyten aktivieren (CD4-Th1-Zellen) oder Signale an B-Zellen weiterleiten, welche die Antikörperproduktion unterstützen (CD4-Th2-Zellen) (Murphy 2009). Die T-Effektorzellen wandern nun entweder an die Stelle der Infektion, um dort eine zelluläre Immunantwort auszulösen oder in lymphatisches Gewebe, um die Immunantwort des angeborenen oder erworbenen Immunsystems zu unterstützen.

Daneben existieren noch weitere T-Zell-Subpopulationen wie z.B. regulatorische T-Zellen (T_{reg}). Sie dienen der Selbstkontrolle des Immunsystems und versuchen Autoimmunität zu verhindern (Asano 1996; Mellanby 2009). CD4-positive T_{reg} werden charakterisiert durch

ihre Expression von CD4 und CD25 und des Transkriptionsfaktor FOXP3. Sie können autoreaktive Lymphozyten deaktivieren und somit Autoimmunreaktionen unterbinden (Murphy 2009).

1.3 Dendritische Zellen

1.3.1 Klassifikation dendritischer Zellen und ihrer Subpopulationen

Dendritische Zellen (DC) sind professionelle antigenpräsentierende Zellen. Sie spielen die zentrale Rolle bei der Regulation einer Immunantwort. Ihr Name weist auf ihre langen Fortsätze hin, welche wie die Verzweigungen eines Baumes¹ aussehen (Murphy 2009). Unter diesem Terminus wurden sie erstmals 1973 als Teil des retikuloendothelialen Systems in peripheren Lymphorganen von Steinmann beschrieben (Steinman 1973). Bereits im 19. Jahrhundert wurde Langerhans auf diese Zellen in der Haut aufmerksam, konnte sie jedoch noch nicht in einen größeren Zusammenhang einordnen (Langerhans 1868).

Die dendritischen Zellen entwickeln sich aus gemeinsamen CD34-positiven Vorläuferzellen des Knochenmarks. Aus dem Knochenmark wandern die unreifen dendritischen Zellen über den Blutstrom in die peripheren Gewebe. Beim Menschen sind folgende Subpopulationen dendritischer Zellen beschrieben: konventionelle myeloide dendritische Zellen, welche von myeloiden Vorläuferzellen abstammen und plasmazytoide dendritische Zellen (PDC), welche von lymphoiden Vorläuferzellen abstammen (Sato 2007; Martin 2009). Die myeloiden dendritischen Zellen (MDC) lassen sich anhand von Oberflächenmarkern unterteilen in MDC1 (BDCA-1⁺CD1a⁺CD4⁺CD11c⁺⁺CD123^{+/-}) und MDC2 (BDCA-3⁺CD1a⁻CD4⁺CD11c⁺CD123⁻) (Dzionek 2003; Sato 2007). Beide sind hocheffektive antigenpräsentierende Zellen für die Aktivierung von CD4- und CD8-positiven Lymphozyten und exprimieren TLR4, aber nicht TLR7 und TLR9. Plasmazytoide dendritische Zellen sind durch die Oberflächenmoleküle BDCA-2⁺BDCA-4⁺CD1a⁻CD4⁺CD11c⁻CD123⁺⁺ charakterisiert und eine der Hauptquellen für die Sekretion von Typ 1 Interferonen (Interferon- α und - β) (Ito 2001). Weiterhin exprimieren plasmazytoide dendritische Zellen die intrazellulären Rezeptoren TLR7 und TLR9. Über diese können sie virale und bakterielle DNA erkennen (Murphy 2009).

¹ Déndron (griech.), Baum

Dendritische Zellen finden sich im Blut und in lymphatischen Organen (Milz, Lymphknoten). Als interstitielle dendritische Zellen sind sie aber auch in allen anderen Geweben anzutreffen. In Geweben mit hoher Antigendichte, wie beispielsweise die Haut, sind sie besonders zahlreich vertreten. In der Haut werden die dendritischen Zellen als Langerhans-Zellen bezeichnet. Im peripheren Blut hingegen sind sie mit einer Prävalenz von 0,1-1 % der mononukleären Zellen in relativ geringer Anzahl vorhanden (Reid 1997).

1.3.2 Die Funktion dendritischer Zellen

Dendritische Zellen sind Vermittler zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem. Ihre Funktion ist die Aufbereitung von Antigenen und deren Präsentation gegenüber T-Zellen. Als unreife DC nehmen sie fortwährend große Mengen an Antigenen aus der Umgebung über Phagozytose und Pinozytose auf (Selbstantigene und Antigene von Mikroorganismen) und prozessieren diese in lysosomalen Kompartimenten in kleine Peptidfragmente, um sie auf der Oberfläche im Kontext der MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle dem Immunsystem zu präsentieren (Sato 2007).

Im unreifen, nicht aktivierten Stadium exprimieren sie nur geringe Mengen an MHC-Klasse-I-, MHC-Klasse-II- und kostimulatorischen Molekülen. Durch den Kontakt mit bestimmten Antigenen, die „Gefahr“ signalisieren (exogene und endogene Signaturen, siehe 1.2.1) oder inflammatorisch wirkenden Zytokinen und Chemokinen werden dendritische Zellen zur Reifung stimuliert (Stockwin 2000; Sato 2007). Während dieses Prozesses erhöhen die dendritischen Zellen die Expressionsrate von MHC und kostimulierenden Molekülen (z.B. CD40, CD80, CD86) und beginnen proinflammatorische und antivirale Zytokine zu sezernieren (z.B. IL-12), welche der Aktivierung naiver T-Zellen dienen (Sato 2007). Welche Zytokine freigesetzt werden, ist davon abhängig, welche Mustererkennungsrezeptoren der dendritischen Zellen durch den Antigenkontakt aktiviert wurden (Martin 2009; Murphy 2009). Durch diese drei verschiedenen Signale wird sichergestellt, dass das erworbene Immunsystem nur bei Gefahr wirklich aktiviert wird und die Stärke der Aktivierung fein reguliert werden kann.

Durch die Präsentation der Antigenpeptide auf MHC-Klasse-I-Molekülen treten dendritische Zellen mit den T-Zellrezeptor von CD8-positiven-T-Zellen in Kontakt, während die Bindung des T-Zellrezeptors der CD4-positiven T-Zellen über den Peptid-MHC-Klasse-II-Komplex erfolgt (Steinman 2007; Martin 2009). Zur Aktivierung benötigen die T-Zellen ein zweites Signal, die Interaktion mit den sogenannten kostimulatorischen Oberflächenmole-

külen. Zusätzlich wird die Aktivierung durch das lokale Zytokinmilieu gesteuert (Stockwin 2000). Fehlt dieses zweite Signal durch die kostimulierenden Moleküle werden die T-Zellen antigenspezifisch nicht aktiviert, sondern im Sinne einer Anergie oder Toleranz supprimiert.

Die Interaktion zwischen dendritischen Zellen, T-Zellen sowie B-Zellen findet nicht in der Peripherie, sondern im lymphatischen Gewebe statt (Reid 1997). Die antigenbeladenen dendritischen Zellen wandern aus dem lokalen Gewebe, geleitet über einen Chemokingradienten, zum nächsten drainierenden Lymphknoten oder der Milz (Cyster 1999). Dort treten sie in Interaktion mit naiven Lymphozyten und Gedächtniszellen und können über Antigenpräsentation und Kostimulation T- und B-Zellen aktivieren. Zusätzlich können reife dendritische Zellen Zellen des unspezifischen Immunsystems wie z.B. natürliche Killerzellen (NK), NK-T-Zellen und $\gamma\delta$ -Antigenrezeptor-positive-T-Zellen aktivieren (Lucas 2007). Die aktivierten antigenspezifischen Lymphozyten schwärmen in die Peripherie aus und können ihre Funktion als T-Helferzellen oder zytotoxische T-Zellen entfalten.

Es ist von großer Bedeutung, dass die von den dendritischen Zellen induzierte Immunantwort nicht außer Kontrolle gerät. Dies geschieht unter anderem mit Hilfe von nicht-aktivierten dendritischen Zellen oder den sogenannten regulatorischen dendritischen Zellen, welche keine pro-, sondern antiinflammatorische Zytokine (z.B. IL-10) produzieren. Dies kann sowohl zur T-Zellanergie als auch zur Aktivierung regulatorischer T-Zellen (T_{reg}) führen (Stockwin 2000; Martin 2009).

1.3.3 Die Rolle der dendritischen Zellen bei Autoimmunerkrankungen

Dendritische Zellen sind sowohl in der Lage das Immunsystem zu stimulieren als auch zu supprimieren (Tan 2005). Über die Präsentation von Selbstantigenen sind die dendritischen Zellen an der Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz beteiligt (Steinman 2003; Maldonado 2010). Diese ambivalente Fähigkeit macht sie zu interessanten und vielversprechenden Forschungsobjekten, insbesondere in Bezug auf Autoimmunerkrankungen. Es konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise Typ 1 Diabetes, Autoimmunthyreoiditis oder rheumatoider Arthritis, die Reifung dendritischer Zellen und somit die Antigenpräsentation und Immunsystemmodulation gestört ist. Bei der rheumatoiden Arthritis wurde beobachtet, dass sich dendritische Zellen im geschädigten Gewebe sehr früh und in großer Anzahl nachweisen lassen. Es wird vermutet, dass in der Synovia enthaltenes TNF- α und GM-CSF dendritische Zellen

aktiviert und an der Induktion einer (Auto-) Immunreaktion beteiligt sind (MacPherson 1995; Mottonen 1998; Thomas 1999).

Im Mausmodell des Typ 1 Diabetes, der NOD-Maus, konnte gezeigt werden, dass die dendritischen Zellen und Makrophagen zu jenen Zellen gehören, welche am frühesten in die Langerhans'schen Inseln infiltrieren und dort Zytokine sezernieren (Lee 1988; Dahlen 1998; Welzen-Coppens 2011). Welche Signale die APZ in der prädiabetischen Phase aktivieren ist bisher noch nicht hinreichend geklärt (Stockwin 2000). Jedoch konnte Turley zeigen, dass bei β -Zell-Untergang Peptide freigesetzt werden, welche von APZ aufgenommen, den T-Zellen präsentiert werden und somit eine Immunreaktion auslösen. Hierbei waren dendritische Zellen die relevanten APZ (Turley 2003). Durch die Behandlung mit nicht-aktivierten, tolerogenen dendritischen Zellen kann die Diabetesentwicklung in der NOD-Maus verhindert werden (Krüger 2003).

1.3.4 Dendritische Zellen und Diabetes mellitus

Beim Typ 1 Diabetes sind DC und Makrophagen über die Aktivierung von proinflammatorischen autoreaktiven T-Lymphozyten und durch die Freisetzung von toxischen Zytokinen ($IL-1\beta$, $TNF\alpha$) am β -Zell-Untergang beteiligt (Diana 2011). Nach der Schädigung von β -Zellen durch Umweltfaktoren können Makrophagen und DC aus dem Blut rekrutiert werden und je nach Aktivierungsgrad entweder stimulierend oder inhibierend auf T-Lymphozyten wirken. Im Tiermodell konnte der NOD-Maus eine Antigenpräsentation von myeloiden DC nachgewiesen werden. Proinflammatorisch aktivierte myeloide DC (hohe Präsentation von kostimulierenden Molekülen, Sekretion von IL-12) führen zu einer starken zytotoxischen Immunreaktion (Poligone 2002; Steptoe 2002). Ein Baustein in der DC-Aktivierung stellt der TLR2-Signalweg dar. Kim konnte 2011 demonstrieren, dass TLR2-defiziente NOD-Mäuse signifikant weniger Autoimmundiabetes entwickelten (Kim 2011). Daraus ergab sich die Theorie, dass eine Blockade des TLR2-Signalweges ein therapeutischer Ansatz zur Verhinderung des Typ 1 Diabetes sei. Unreife oder antiinflammatorisch ($IL-10$ -Milieu) stimulierte DC begünstigen die Generierung von FOXP3-positiven regulatorischen T-Zellen und wirkten diabetesprotektiv (Tang 2008; Serreze 2011). Neben den myeloiden DC sind auch PDC an der Entstehung eines Typ 1 Diabetes beteiligt. Die Aktivierung von PDC über TLR7 und TLR9 kann die Produktion von $IFN-\alpha$ aktivieren. $IFN-\alpha$ wiederum induziert die T-Zell-vermittelte Immunreaktion und somit auch Autoimmunität (Li 2008). Blockiert man die $IFN-\alpha$ -Rezeptoren in NOD-Mäusen kann ein Autoimmundiabetes verhindert werden (Li 2011). In Abbildung 4 ist das Zusam-

menspiel der Immunzellen und der Zytokine bei der Pathogenese des Typ 1 Diabetes dargestellt.

Auch bei der Entstehung des Typ 2 Diabetes spielt das angeborene Immunsystem eine wichtige Rolle. Viszerale Adipositas in Kombination mit Hyperlipidämie ist ein entscheidender Baustein bei der Entstehung von Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes. TNF- α wird gemeinsam mit anderen Zytokinen und Adipokinen vom viszeralen Fettgewebe freigesetzt (Shi 2004). Im Blut zirkulierende Monozyten können nach ihrer Aktivierung ins Fettgewebe auswandern, im Gewebe durch zahlreiche Metabolite, die bei metabolischen Syndrom freigesetzt werden (z.B. freie Fettsäuren, Ceramide) in Makrophagen differenzieren und zusätzlich vermehrt proinflammatorische Zytokine wie z.B. TNF- α , IL-1 β und IL-6 sezernieren (Harford 2011). Aus dem Knochenmark stammende CD11c-positive DC können ebenfalls durch freie Fettsäuren aktiviert werden und sind bei adipösen Mäusen vermehrt in Muskel- und Fettgewebe nachweisbar (Nguyen 2007). Vor kurzem konnte im Tierversuche gezeigt werden, dass die Depletion von CD11c-positiven Immunzellen (Makrophagen und myeloide DC) zu einer Reduktion der systemischen Inflammation, zu einer Steigerung der Insulinsekretion und zu einer Verbesserung der Glukosetoleranz führt (Patsouris 2008). Typ 2 Diabetiker haben gegenüber gesunden Kontrollpersonen gleichen Alters erhöhte Serumspiegel von proinflammatorischen Zytokinen und Adipokinen sowie des Akute-Phase-Proteins C-reaktives Protein (CRP) (Rodriguez-Moran 1999; Leinonen 2003). Die proinflammatorischen und proatherogenen Faktoren bewirken eine klinisch relevante Steigerung der Insulinresistenz und sind damit von entscheidender Rolle in der Pathogenese des Typ 2 Diabetes (Pickup 1997a; Kohn 2005; Fernandez-Real 2012).

Aufgrund der zentralen Kontrollfunktion der dendritischen Zellen bei der Induktion und Regulation der Immunantwort stellt sich die Frage, inwieweit die Aktivierung des angeborenen Immunsystems bei Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2 auch die dendritischen Zellen betrifft und ob hier gegebenenfalls eine Fehlregulation der verschiedenen Typen von dendritischen Zellen vorliegt.

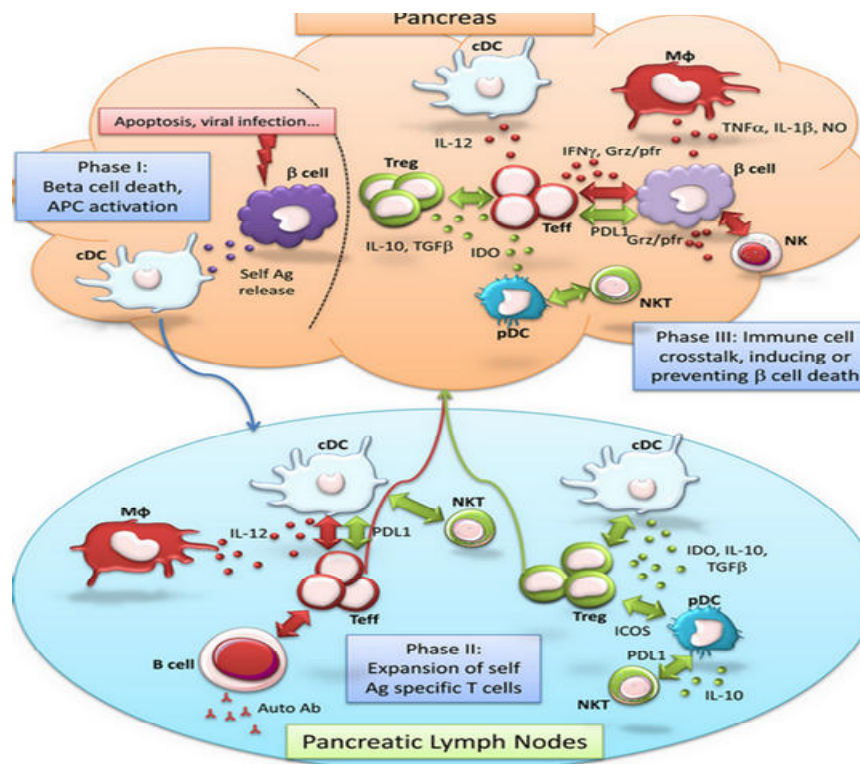


Abbildung 4: Interaktion des erworbenen und angeborenen Immunsystems bei der Entstehung des Typ 1 Diabetes

Abbildung aus dem Artikel „Innate Immunity in Type 1 Diabetes“ von Julien Diana (Diana 2011)

Konventionelle DC (cDC) induzieren Typ 1 Diabetes durch Aufnahme und Prozessierung von β-Zell-Antigenen nach β-Zelluntergang. Dieser Vorgang kann auf physiologischer Apoptose oder viraler Infektion beruhen. Im zweiten Falle kann die antivirale Antwort über das Zusammenspiel natürlicher T-Killerzellen (NKT) und pDC effektiv virale Vervielfältigung, Gewebeschaden und Typ 1 Diabetes verhindern. Mit Selbstantigenen beladene cDC wandern in den nachfolgenden Lymphknoten und aktivieren hier weitere cDC und T-Zellen mittels Sekretion proinflammatorischer Zytokine. B-Zellen befinden sich im Pankreas und Lymphknoten, wo sie Autoantikörper sezernieren und T-Zellen β-Zellantigene präsentieren können. Daraufhin können alle sich im Pankreas befindlichen Zellen wie aktivierte Makrophagen, diabetogene T-Zellen und NKT β-Zellen über verschiedene Effektormoleküle zerstören. Zellen des angeborenen Immunsystems wie DC können jedoch je nach Zytokinmilieu und/oder dem Stimulus (wie Virusinfektion) regulatorische T-Zellen aktivieren über Produktion von IDO, IL-10 und TGF-β. NKT vermitteln die Rekrutierung und tolerogene Funktion der cDC und pDC. β-Zellen können ihre Zerstörung auch selbständig verhindern via Inhibition diabetogener T-Zellen über den PD-L1/PD-1-Pfad. So hat das angeborene Immunsystem eine duale Funktion, indem es die Entstehung von Typ 1 Diabetes unterstützen oder verhindern kann. Abkürzungen: Ag, Antigen; APC, Antigen-präsentierende Zelle; cDC, konventionelle dendritische Zelle; ICOS, inducible T cell co-stimulator; IDO, indoleamine 2,3-dioxygenase; IFN-γ, interferon γ; IL-, Interleukin-; Grz/pfr, granzyme/perforin; Mφ, Makrophage; NK, natürliche Killerzelle, NKT, natürliche T-Killerzelle; NO, Stickstoffmonoxid; pDC, plasmazytoide dendritische Zelle; PD-L1, programmed cell death ligand 1; Teff, Effektor-T-Zelle; TGF-β, tumor growth factor β; TNF-α, Tumor-Nekrose-Faktor α; Treg, regulatorische T-Zelle.

2 Fragestellung der Arbeit

Die Reaktivität des Immunsystems spielt eine zentrale Rolle bei der Entstehung eines Typ 1 Diabetes. Neben der erworbenen Immunantwort mit Auftreten autoreaktiver T-Lymphozyten und diabetesspezifischer Autoantikörper weisen aktuelle Studien darauf hin, dass auch die angeborene Immunität von Bedeutung ist für die Pathogenese des Typ 1 Diabetes. Arbeiten zum Typ 2 Diabetes belegen ebenfalls eine Aktivierung des unspezifischen Immunsystems, welches über eine Erhöhung der subklinischen Inflammation zur Steigerung der Insulinresistenz beiträgt.

Die Rolle von humanen dendritischen Zellen für die Pathogenese des Typ 1 und Typ 2 Diabetes ist bisher noch nicht gut untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb eine Pilotstudie durchgeführt, um zu klären, ob eine Fehlregulation von dendritischen Zellen bei Typ 1 und/oder Typ 2 Diabetes mellitus nachweisbar ist.

Ziele der vorliegenden Arbeit waren:

1. Aussagen über Veränderungen der Subpopulationen von dendritischen Zellen im peripheren Blut von Typ 1 und Typ 2 Diabetikern zu treffen
2. Zu analysieren, ob Unterschiede im Zytokinprofil und/oder dem Expressionsmuster von Oberflächenmarkern der DC zwischen den untersuchten Personengruppen vorliegen
3. Zu überprüfen, ob sich die Reaktivität von mononukleären Zellen auf Stimulation mit TLR-Liganden zwischen Typ 1 und Typ 2 Diabetes unterscheidet und ob generell Unterschiede zwischen gesunden Personen und Diabetikern zu verzeichnen sind

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Reagenzien

Folgende Reagenzien wurden in dieser Studie verwendet:

Substanz	Hersteller
Bovines Serum Albumin, Albumin bovine fraction V	Serva Feinbiochemie GmbH&Co. (Heidelberg)
CL-097, Imidazoquinoline compound	InvivoGen (San Diego)
Ficoll-Hypaque (spezifische Dichte 1073 g/ml)	Amersham Biosciences (Freiburg)
FKS: fetales Kälberserum	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
Flagellin, purified from <i>B. subtilis</i>	InvivoGen (San Diego)
Formaldehyd (36,5 %)	Sigma (Taufkirchen)
FSL-1, synthetic diamylated lipoprotein	InvivoGen (San Diego)
Humanes GM-CSF	Strathmann Biotec GmbH&Co.KG (Hamburg)
Humanes Interleukin-4	PeproTech (Rocky Hill)
Humanes Plasma der Blutgruppe AB	Sigma (Taufkirchen)
Humanes TNF-alpha	Strathmann Biotec GmbH&Co.KG (Hamburg)
Interferon- α	PeproTech (Rocky Hill)
L-Glutamin 200mM (100x)	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
LPS	Sigma (Taufkirchen)
Penicillin/Streptomycin (20x)	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
Poly (I:C), synthetic analog of dsRNA	InvivoGen (San Diego)

Schwefelsäure 1 mol/l - 2N Lösung	Carl Roth GmbH&Co.KG (Karlsruhe)
Stop Solution	R&D Systems (Minneapolis)
Streptavidin	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
Substrat Reagenz	R&D Systems (Minneapolis)
Trypsin-EDTA (10x)	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
Tween 20	Sigma (Taufkirchen)
Versene (100x)	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)

Kits

Blood Dendritic Cell Enumeration Kit	Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach)
DuoSet ELISA Development Systems	R&D Systems (Minneapolis)
Human CCL18/PARC DuoSet	R&D Systems (Minneapolis)
Human IL-10 DuoSet	R&D Systems (Minneapolis)
Human IL-12 p70 DuoSet	R&D Systems (Minneapolis)
Human IL-6 DuoSet	R&D Systems (Minneapolis)
Human TNF-alpha DuoSet	R&D Systems (Minneapolis)

Ein Teil der Substanzen (GM-CSF, IL-4, FSL-1, PIC und LPS) wurden bis zum Gebrauch in kleinen Portionen im Gefrierschrank bei -80°C gelagert und maximal zweimal erneut aufgetaut und eingefroren.

3.1.2 Antikörper

Folgende Antikörper wurden zur Detektion der Oberflächenantigene dendritischer Zellen mittels Durchflusszytometrie verwendet. Die Antikörper wurden bis zur Verwendung bei +4° C im Kühlschrank gelagert und bei längerem Gebrauch bei Raumtemperatur auf Eis gelagert.

Primäre Antikörper	Fluorochrom	Hersteller
BDCA-1	FITC	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
BDCA-3	FITC	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
BDCA-4	PE	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
CD11b	FITC	ImmunoTools (Friesoythe)
CD11c	PE	Serotec (Düsseldorf)
CD123	PE	eBioscience (Frankfurt)
CD16	FITC/PE	BD Pharmingen (Heidelberg)
CD19	APC	ImmunoTools (Friesoythe)
CD1a	FITC	ImmunoTools (Friesoythe)
CD209	FITC	AbD Serotec (Düsseldorf)
CD3	FITC	ImmunoTools (Friesoythe)
CD4	APC	ImmunoTools (Friesoythe)
CD4	PE	ImmunoTools (Friesoythe)
CD56	PE	ImmunoTools (Friesoythe)
CD80	FITC	ImmunoTools (Friesoythe)
CD83	APC	BD Pharmingen (Heidelberg)
CD86	PE	BD Pharmingen (Heidelberg)
HLA-DR	FITC	ImmunoTools (Friesoythe)
Isotyp Mouse IgG1	APC	ImmunoTools (Friesoythe)
Isotyp Mouse IgG1	FITC	ImmunoTools (Friesoythe)
Isotyp Mouse IgG1	PE	ImmunoTools (Friesoythe)
Isotyp Mouse IgG2a	FITC	ImmunoTools (Friesoythe)
Isotyp Mouse IgG2a	PE	ImmunoTools (Friesoythe)
Isotyp Mouse IgG2b	PE	eBioscience (Frankfurt)

3.1.3 Medien und Puffer

Medien und Puffer	Hersteller
Erythrozyten-Lyse-Puffer	82,9 mg NH ₄ Cl, 10 mg KHCO ₃ , 1 ml EDTA-Stammlösung (42 mg/100 ml) auf 10 ml Aqua dest.; pH 7,2
PBS 1x und 10x	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
Reagenz Diluent	1 g Bovines Serum Albumin pro 100 ml PBS; steril filtriert
TAE-Puffer	50 x Stammlösung: 121 g Tris-Base, 28,5 ml Eisessig, 50ml 0.5M EDTA (pH8.0) (auf 0,5 l Wasser); Gebrauchslösung: 40 ml auf 2 l auffüllen
RPMI 1640 ohne Hepes mit stabilem Glutamin und 2,0 g/l NaHCO ₃	Biochrom AG (Berlin)

3.1.4 Geräte

Geräte	Hersteller
Analysenwaage Kern 770	Kern & Sohn (Karlsruhe)
BD FACS Calibur	BD Biosciences (Heidelberg)
BIOFUGE fresco	Heraeus (Hanau)
Brutschrank APT.LINE CB	Binder (Tuttlingen)
Brutschrank Heracell	Heraeus (Hanau)
Magnetrührer Heidolph MR 3001	Heidolph (Schwabach)
Mikroskop Fluovert	Leitz (Wetzlar)
Mini-Zentrifuge Spectrafuge	NeoLab (Heidelberg)
Multipipette Research plus multichannel 100 µl	Eppendorf (Hamburg)
Multipipette Research plus multichannel 300 µl	Eppendorf (Hamburg)
Neubauer Improved Bright Line Zählkammer Tiefe 0,1 mm; 0,0025 mm ²	Brand (Wertheim)
Nunc Immuno Wash 12	Nunc (Langenselbold)
Pipetus Pipettierhilfe	Hirschmann (Eberstadt)
Titramax 100 Mikrotiterplatten Schüttler 150-1350 rpm	Heidolph (Schwabach)

Vortex-Schüttler	VWR International (Darmstadt)
Wasserbad WNB 7-45	Memmert (Schwabach)
Zentrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg)

3.1.5 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
1,5 ml Tubes	Eppendorf (Hamburg)
15 ml, 50 ml Tubes	Corning (München)
50 ml Tubes	BD / Falcon (Heidelberg)
BD Discardit II 20 ml Spritzen	BD (Heidelberg)
Costar Stripette (1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning (München)
Deckel für Microtestplatte 96 Vertiefungen	Nunc (Langenselbold)
Deckgläser 25x60 mm	Menzel (Braunschweig)
Mikrotiterplatten (6/12/24 Well)	Corning (München)
Millex GP Filter Unit 0,22 µm	Millipore (Cork)
neoScrew Microtubes 1,5 ml	NeoLab (Heidelberg)
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 300 µl, 1000 µl)	Brand (Wertheim)
Pipettenspitzen (1200 µl)	Eppendorf (Hamburg)
Rundbodenröhrchen 5 ml	BD / Falcon (Heidelberg)
Serologische Pipetten (1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	BD / Falcon (Heidelberg)
U96 Maxisorp Nunc Immunoplates	Nunc (Langenselbold)
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 150 cm ²)	Corning (München)
Zellschaber (cell scraper)	Sarstedt (Nümbrecht)

3.1.6 Patientenauswahl

Folgende Gruppen von Patienten wurden untersucht:

- Typ 1 Diabetiker (Erstdiagnose $\leq 1,5$ Jahre bei Blutentnahme)
- Typ 2 Diabetiker (Erstdiagnose ≤ 5 Jahre bei Blutentnahme)
- Gestationsdiabetikerinnen (Diagnose bestätigt durch oGTT)
- Gesunde Personen als Kontrollgruppe

Weitere Einschlusskriterien waren:

- Ausschluss weiterer chronischer Erkrankungen
- Keine Vorbehandlung mit Kortikosteroiden oder Immunsuppressiva

Eine Übersicht zur näheren Charakterisierung der Gruppen findet sich in Tabelle 2.

	Typ 1 DM	Typ 2 DM	GDM	Kontrollen
Männer	5	6	-	11
Frauen	4	6	9	17
Gesamt	9	12	9	28
Alter (Jahre)	33,4 \pm 11,1	58,8 \pm 12,9	35,0 \pm 4,8	37,2 \pm 14,9
Alter (Spannweite)	(17-57 J.)	(36-79 J.)	(25-40 J.)	(22-67 J.)
BMI (kg/m ²)	21,7 \pm 3,9	29,2 \pm 5,2	28,5 \pm 5,8	22,7 \pm 3,8
HbA1c (%)	9,5 \pm 3,7	6,7 \pm 1,4	5,4 \pm 0,3	5,4 \pm 0,4
Diabetesdauer in Jahren	0,8 \pm 0,7	2,4 \pm 1,7	ED*	-

Tabelle 2: Anthropometrische und klinische Daten der untersuchten Personengruppen

Mittelwert \pm Standardabweichung; ED* = die Blutentnahme erfolgte zum Zeitpunkt der Erstdiagnose

3.1.7 Entnahme und Verarbeitung der verwendeten Blutproben

Vor jeder Blutentnahme wurden die Probanden über die Risiken einer Blutentnahme und die Weiterverarbeitung der Proben in dieser Studie aufgeklärt. Eine Patienteneinverständniserklärung, sowie eine Genehmigung der Ethikkommission lagen vor. Es wurden von jedem Probanden je 40 ml venöses Heparinblut (Heparinröhrchen) sowie je 5 ml EDTA-Blut mittels standardisierter Blutentnahme entnommen. Aus dem EDTA-Blut wurde im Zentrallabor der Medizinischen Klinik Innenstadt München ein kleines Blutbild mit folgenden Parametern bestimmt: Leukozyten, Thrombozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, MCH, MCV und MCHC. In Abbildung 5 ist die Anwendungsreihenfolge der Methoden zum besseren Verständnis dargestellt.

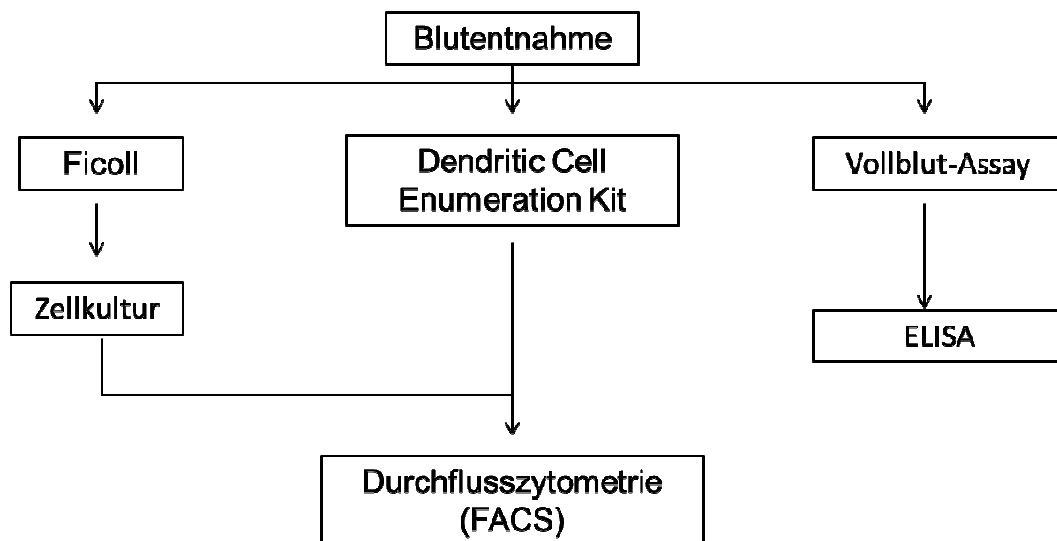


Abbildung 5: Übersicht der Blutaufbereitung und des Untersuchungsschemas

3.1.8 Gewinnung humaner dendritischer Zellen aus Vollblut

Um humane dendritische Zellen (DC) zu kultivieren und zu vermehren, mussten zunächst Monozyten aus Vollblut von den übrigen Zellpopulationen getrennt werden. Dies erfolgte unter Verwendung von Ficoll-Hypaque. Das Ficoll-Prinzip beruht auf der Auftrennung verschiedener Zellpopulationen durch Dichte-Zentrifugation unter Verwendung einer speziellen Flüssigkeit (Ficoll). Mit einer spezifischen Dichte von 1073 g/ml ermöglicht diese Flüssigkeit die Entstehung einer Phasengrenze zwischen dem Ficoll und dem Blut-RPMI-

Gemisch. Dabei sedimentieren Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihrer höheren Dichte nach unten, Thrombozyten finden sich in der oberen Schicht und mononukleäre Zellen setzen sich als Interphase zwischen beiden Schichten ab. Abbildung 6 zeigt die graphische Darstellung des eben beschriebenen Ficoll-Prinzips. Anschließend wurde die Interphase vorsichtig abgenommen und in RPMI gewaschen. Die mononukleären Zellen wurden in eine Zellkulturflasche überführt. Die Generierung der humanen dendritischen Zellen aus mononukleären Zellen ist im nachstehenden Protokoll beschrieben.

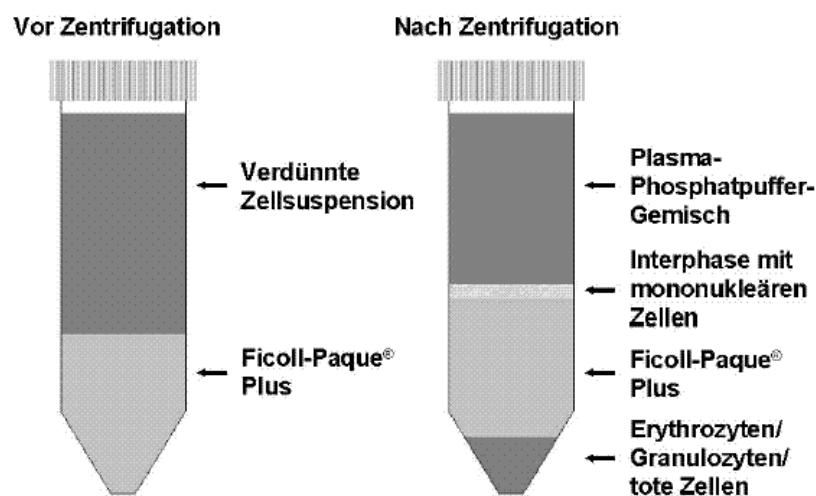


Abbildung 6: Isolierung von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut mit Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

Abbildung aus der Dissertation von Tripmacher 2005 (Tripmacher 2005)

Protokoll zur Isolierung von Monozyten und Herstellung von dendritischen Zellen

- 40 ml heparinisiertes venöses Vollblut 3:1 mit RPMI 1640 mit 2 mM L-Glutamin verdünnen (2 Teile Medium + 1 Teil Blut)
- Ficoll Hypaque in einem 50 ml Tube vorsichtig mit RPMI-Heparinblut-Gemisch im Verhältnis 1:1 überschichten
- Probe bei 500g, Raumtemperatur, 20 Minuten ohne Bremse und Beschleunigung zentrifugieren
- Interphase abnehmen, diese zweimal in RPMI waschen, dabei jeweils acht Minuten bei 300g, Raumtemperatur, mit Bremse und Beschleunigung zentrifugieren
- Überstand abnehmen und verwerfen, Pellet in 4 ml RPMI lösen
- Probe (= gelöstes Pellet) in Neubauer-Zählkammer zählen, dabei jeweils das obere und das untere Feld der Neubauer-Zählkammer mit der Probe beschich-

ten. Hierbei die Probe vorsichtig zwischen Glasdeckel und Zählkammer pipettieren. Probe gegebenenfalls 1:10 mit PBS verdünnen (10 µl Probe + 90 µl PBS in neuem Tube), falls sonst keine Auszählung möglich ist.

- Anschließend Probe mit RPMI + 10 % FKS, bzw. RPMI + 2 % hABS oder X-Vivo-Medium auf Zellkulturflasche geben und bei +37°C für 90 Minuten inkubieren
- Nicht-adhärenente Zellen werden nach 90 Minuten wieder abgesaugt
- Anschließend das fertige gewünschte Medium auf die Flasche geben und die Zellen für sechs Tage im Zellkulturschrank bei +37°C kultivieren

3.1.9 Kulturbedingungen der Monozyten und Generierung von humanen dendritischen Zellen

Die mit Ficoll gewonnenen Monozyten wurden im Brutschrank bei +37°C und 5 % Kohlendioxid über sechs Tage inkubiert. Bei einer Zellzahl bis zu 25×10^6 Zellen wurden sie in einer 25 cm² Zellkulturflasche mit 5 ml Medium, bei größerer Zellzahl in einer 75 cm²-Flasche mit 15 ml Medium kultiviert. Zu Beginn der Versuche wurden verschiedene Medienzusammensetzungen ausgetestet. Als Basismedium wurde RPMI 1640 verwendet. Wie von Romani 1994 beschrieben wurden weiterhin FKS oder humanes AB-Serum (hABS) eingesetzt (Romani 1994; Gill 2002). Diesem Gemisch wurden orientierend an einem Protokoll von Dauer 2003 mehrere Stimulantien hinzugefügt: Granulozyten Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) und Interleukin-4 (IL-4) oder GM-CSF, Interferon- α (INF- α) und IL-4 (Gill 2002; Dauer 2003a).

Medienzusammensetzung unter Verwendung von RPMI mit FKS**RPMI mit FKS und IL-4**

RPMI 1640 mit 2 mM Glutamin	89 %
Fetales Kälberserum (FKS)	10 %
Penicillin/Streptomycin 10000 U/ml/10000 µg/ml	1 %
Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (hGM-CSF)	50 ng/ml
Interleukin-4	500 U/ml

RPMI mit FKS und IFN- α

RPMI 1640 mit 2 mM Glutamin	89 %
Fetales Kälberserum (FKS)	10 %
Penicillin/Streptomycin 10000 U/ml/10000 µg/ml	1 %
Interferon- α	20 ng/ml
Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (hGM-CSF)	50 ng/ml

RPMI mit FKS, IL-4 und IFN- α

RPMI 1640 mit 2 mM Glutamin	89 %
Fetales Kälberserum (FKS)	10 %
Penicillin/Streptomycin 10000 U/ml/10000 µg/ml	1 %
Interferon- α	20 ng/ml
Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (hGM-CSF)	50 ng/ml
Interleukin-4	500 U/ml

Medienzusammensetzung unter Verwendung von RPMI und hABS**RPMI mit hABS und IL-4**

RPMI 1640 mit 2 mM Glutamin	89 %
Humanes AB Serum	2 %
Penicillin/Streptomycin 10000 U/ml/10000 µg/ml	1 %
Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (hGM-CSF)	50 ng/ml
Interleukin-4	500 U/ml

RPMI mit hABS und IFN- α

RPMI 1640 mit 2 mM Glutamin	89 %
Humanes AB Serum	2 %
Penicillin/Streptomycin 10000 U/ml/10000 µg/ml	1 %
Interferon- α	20 ng/ml
Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (hGM-CSF)	50 ng/ml

RPMI mit hABS, IL-4 und IFN- α (= DC-M)

RPMI 1640 mit 2 mM Glutamin	89 %
Humanes AB Serum	2 %
Penicillin/Streptomycin 10000 U/ml/10000 μ g/ml	1 %
Interferon- α	20 ng/ml
Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (hGM-CSF)	50 ng/ml
Interleukin-4	500 U/ml

Medienzusammensetzung bei Verwendung von X-Vivo 20**X-Vivo mit IL-4**

X-Vivo 20 mit Genatmicin und Phenolrot	100 %
Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (hGM-CSF)	50 ng/ml
Interleukin-4	500 U/ml

X-Vivo mit IFN- α

X-Vivo 20 mit Genatmicin und Phenolrot	100 %
Interferon- α	20 ng/ml
Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (hGM-CSF)	50 ng/ml

X-Vivo mit IL-4 und IFN- α

X-Vivo 20 mit Genatmicin und Phenolrot	100 %
Interferon- α	20 ng/ml
Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (hGM-CSF)	50 ng/ml
Interleukin-4	500 U/ml

Am Tag 3 erfolgte ein jeweils ein Mediumwechsel. Dabei wurde altes Medium abgesaugt und in einem frischen Falconröhrchen bei 144g für acht Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Das Zellpellet wurde in neuem Medium resuspendiert und in die alte Flasche gegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation für weitere drei Tage bei +37°C im Zellkulturschrank. Am Tag 5 wurde 1 ml Medium von der Zellkulturflasche abgenommen, bei 300g und Raumtemperatur für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei -80°C eingefroren. Ebenfalls an Tag 5 erfolgte die Aktivierung der nun erzeugten humanen dendritischen Zellen mit TNF- α (20 ng TNF- α pro ml Medium). Zur Ablösung der Zellen von der Zellkulturflasche an Tag 6 wurde das nachstehende Protokoll verwendet.

Abnahme der hDC von der Zellkulturflasche

- Altes Medium aus Zellkulturflasche absaugen, in ein neues Tube geben und bei Raumtemperatur für acht Minuten bei 144g zentrifugieren
- Überstand absaugen und Pellet in 50 µl PBS + 1 % FKS resuspendieren
- Je 3 ml EDTA 1x (2,7 ml PBS + 300 µl Versene) pro 25 cm² auf die Zellkulturflasche geben und diese zehn Minuten bei +37°C inkubieren
- Je 3 ml PBS + 10 % FKS (2,7 ml PBS + 30 µl FKS) pro 25 cm² nach Inkubation hinzugeben und für zwei Minuten blocken
- Flüssigkeit aus Zellkulturflaschen in Tubes (mit Pellet aus altem Medium) pipettieren und bei 144g, Raumtemperatur, acht Minuten zentrifugieren
- Überstand absaugen und Pellet in 500 µl PBS + 1 % FKS resuspendieren
- Zellen in Neubauer-Zählkammer zählen. Dazu die Proben gegebenenfalls 1 :10 mit PBS in einem neuen Tube verdünnen (10 µl Probe + 90 µl PBS)
- Der Zellzahl entsprechend die Probe nochmals für acht Minuten bei 850 rpm und Raumtemperatur abzentrifugieren. Überstand absaugen und die Zellen in der benötigten Menge PBS + 1 % FKS lösen. Pro Rundbodenröhrchen sollten am Ende 500.000 Zellen gelöst in 50 µl PBS + 1 % FKS vorliegen

3.1.10 Analyse der Oberflächenantigene dendritischer Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS)

Die Bezeichnung FACS steht für Fluorescence activated cell sorting. Im Deutschen ist diese Methode unter dem Begriff Durchflusszytometrie bekannt. Sie ermöglicht die Untersuchung einzelner Zellen hinsichtlich ihrer Größe, Granularität und der Expression von Oberflächenantigenen und intrazellulären Antigenen. Um Oberflächenantigene im Durchflusszytometer zu untersuchen, müssen sie mit fluoreszenz-markierten monoklonalen Antikörpern markiert werden, die spezifisch an Oberflächenantigene binden. Es gibt unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe. In dieser Arbeit wurden Fluoresceinisothiocyanat (FITC; grün), Phycoerythrin (PE; rot), Phycoerythrin-Cyanin 5 (PECy5; rot) und Allophycocyanin (APC; blau) verwendet. Sie unterscheiden sich bezüglich ihres Emmisionsmaximums, d.h. der Wellenlänge des Lasers, bei welcher sie die maximale Signalstärke zeigen. Das Maximum liegt zwischen 519 nm (FITC) und 660 nm (APC).

Die Durchflusszytometrie beruht auf folgendem technischen Prinzip: die zu untersuchenden Zellen werden mit einer Trägerflüssigkeit im Gerät in eine Suspension gebracht. In einem laminaren Strom werden die Zellen in ihrer Trägerflüssigkeit einzeln an dem Laser

des Durchflusszytometers vorbeigeschleust. Trifft der Laserstrahl auf die Zelle, wird sein Strahl abgelenkt. Dabei unterscheidet man die Ablenkung des Lasers in zwei Richtungen, das Vorwärtstreulicht (forward scatter, FSC) vom Seitwärtstreulicht (side scatter, SSC). Mit dem Vorwärtstreulicht kann die Zellgröße, über das Seitwärtstreulicht die Granularität bestimmt werden. Die so gewonnenen Daten werden in einem Dot-Plot Diagramm dargestellt. Auf der X-Achse findet sich der FSC, auf der Y-Achse der SSC. Die Quantität der Fluoreszenz und somit der Expression der Oberflächenantigene wird in einem Histogramm dargestellt. Mit dem hier verwendeten Gerät konnten maximal drei Fluoreszenzen pro Zelle gemessen werden. Aufgrund der begrenzten Probenmenge konnten pro Proband nicht alle in der Arbeit untersuchten Oberflächenantigene analysiert werden. Für einzelne Oberflächenmarker steht deshalb in den vier Vergleichsgruppen eine unterschiedliche Anzahl an Messdaten zur Verfügung. Dies wird jeweils bei den Ergebnissen mit aufgeführt. Die Färbung der Zellen wurde folgendermaßen durchgeführt:

FACS-Färbeprotokoll

- 1 µl des jeweiligen Antikörpers wurde in 100 µl einer PBS-Lösung (mit 1 % FKS) verdünnt und in ein Rundbodenröhrchen gegeben
- Die Zellen wurden von der Zellkulturflasche durch Inkubation mit Versene abgenommen und in der Neubauerkammer gezählt (siehe 3.2.3). Das Pellet wurde anschließend in einer PBS-Lösung (mit 1 % FKS) aufgenommen. Die Menge an PBS wurde so gewählt, dass die Zahl der Zellen in 100 µl zwischen 200.000 und 500.000 lag
- Zu je 100 µl der Zelllösung wurden je 1 µl des jeweiligen Antikörper bzw. des Isotyps gegeben und für 30 Minuten im Kühlschrank inkubiert
- Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten bei 300g zentrifugiert und der Überstand abgenommen
- Das Pellet wurde in 250 µl PBS-Lösung (mit 1 % FKS) aufgenommen
- Zu der Suspension der gefärbten Zellen wurden 250 µl Formalin (3,6 % in PBS) gegeben. Es folgte eine Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur und in Dunkelheit
- Das Formalin wurde durch einmaliges Waschen mit PBS-Lösung (mit 1 % FKS) entfernt
- Am Ende wurde das Pellet in 250 µl PBS-Lösung (mit 1 % FKS) aufgenommen und bis zur Messung bei +4°C in Dunkelheit aufbewahrt

Eine genaue Aufstellung der verwendeten Antikörper und ihre Spezifität für bestimmte Subpopulationen von DC sind in der Tabelle 3 aufgeführt.

Antikörper	MDC1	MDC2	PDC	Antikörper	MDC1	MDC2	PDC
BDCA-1	+	-	-	CD19	-	-	-
BDCA-3	±	++	±	CD56	-	-	-
BDCA-4	-	-	+	CD80	-	-	-
CD1a	-	-	-	CD83	-	-	-
CD3	-	-	-	CD86	+	+	+
CD4	-	-	-	CD123	+	±	++
CD11c	++	+	-	CD209	+	+	-
CD14	±	±	-	HLA-DR	++	+	+
CD16	-	-	-				

Tabelle 3: Phänotyp der DC-Subpopulationen

Die Tabelle wurde mit Bezug auf Veröffentlichungen von Breitling 2006 und Koppel 2005, sowie den Referenzwerten des DC-EK von Miltenyi Biotec erstellt (Koppel 2005; Breitling 2006). Widersprüchliche Angaben sind nicht vollständig wiedergegeben. – kennzeichnet die DC-Subpopulation als negativ für das entsprechende Oberflächenantigen, +/++ gibt Positivität an. Bei ± ist laut Literatur sowohl Positivität als auch Negativität möglich.

Die FACS-Analyse erfolgte mit dem FACS Calibur Gerät der Firma BD Biosciences (Heidelberg). Die erfassten Rohdaten wurden per Computer mit der Software WinMDI Version 2.9 ausgewertet.

Anhand der mittels FACS-Analyse gewonnenen Daten konnten Histogramme und Dot-Plots erstellt werden. Durch die Histogramme konnten Expressionsstärke und Expressionsintensität der gemessenen Antikörper und damit indirekt der Oberflächenantigene bestimmt werden. Mit Hilfe der Dot-Plots ließ sich eine Gegenüberstellung der in einer gemeinsamen Probe gemessenen Antikörper anfertigen.

Eine beispielhafte Verteilung der Zellpopulationen in einem Dot-Plot mit FSC gegen SSC ist in Abbildung 7 dargestellt:

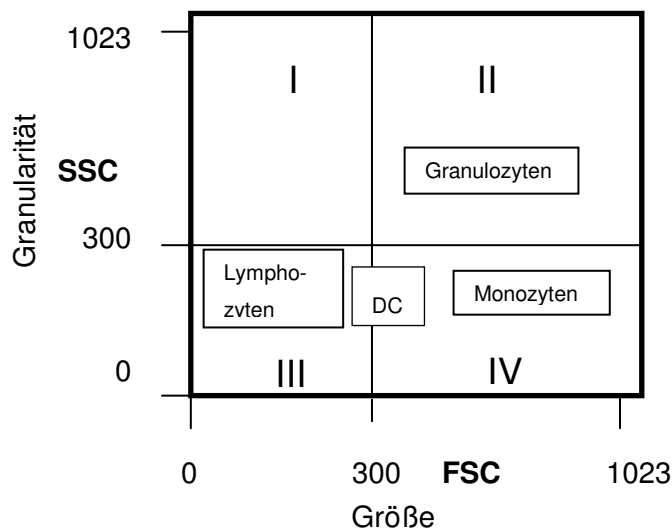


Abbildung 7: Zellverteilung im Dot-Plot FSC gegen SSC

Die römischen Ziffern I-IV bezeichnen die Quadranten, in denen sich die Zellpopulationen typischerweise wiederfinden. Dabei zeigen sich kleine und gering granulierte Zellen, wie die Lymphozyten, in Quadrant III, große und stark granulierte Zellen in Quadrant II. In Quadrant IV finden sich große, jedoch gering granulierte Zellen, in Quadrant I kleine und stark granulierte Zellen.

3.1.11 Quantifizierung verschiedener DC-Subpopulationen im peripheren Blut mittels Dendritic Cell Enumeration Kit

Für die Messung der Zahl der plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDC) und der myeloiden dendritischen Zellen (MDC) im peripheren Blut wurde der Blood Dendritic Cell Enumeration Kit (DC-EK) verwendet. Mit diesem Assay kann die Zahl der PDC, der Typ 1 MDC (MDC1) sowie der Typ 2 MDC (MDC2) bestimmt werden. Es lassen sich PDC über die Oberflächenantigene CD303 (BDCA-2) und CD304 (BDCA-4) identifizieren, MDC1 mittels CD1c (BDCA-1) und MDC2 durch CD141 (BDCA-3) (Dzionek 2002). Der Assay wurde gemäß der Anleitung der Firma Miltenyi Biotec durchgeführt.

Färbeprotokoll des Blood Dendritic Cell Enumeration Kit (DC-EK)

Vorbereitung:

- Herstellung von 10 ml Puffer: PBS + 0,5 % Bovines Serum Albumin (BSA)
- Verdünnung von 1 ml Red Blood Cell Lysis Solution durch Zugabe von 9 ml destilliertem Wasser
- Bestimmung der absoluten Leukozytenzahl pro ml Vollblut mittels eines kleinen Blutbildes im Zentrallabor der Medizinischen Klinik Innenstadt, München

Färbung:

- In zwei Rundbodenröhrchen je 300 µl mit Heparin antikoaguliertes Vollblut geben
- Zugabe von 20 µl Anti-BDCA Cocktail zu der einen Probe und Zugabe von 20 µl Control Cocktail zu der anderen Probe
- Zugabe von 10 µl Dead Cell Discriminator zu beiden Proben
- Sanft mischen und beide Röhrchen in horizontaler Position auf Eis unter einer 60 Watt Lampe (Distanz ca. 3-5 cm) für 10 Minuten inkubieren
- Zugabe von 4 ml 1x Red Blood Cell Lysis Solution zu jeder Probe
- Proben sanft mischen und für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
- Zellen bei 300g für fünf Minuten abzentrifugieren. Überstand vollständig verworfen und die Zellen anschließend mit 4 ml Puffer resuspendieren
- Zellen erneut bei 300g für fünf Minuten abzentrifugieren. Überstand verworfen und Zellen in 300 µl Puffer lösen
- Zugabe von 150 µl Fix Solution und 5 µl Discriminator Stop Reagent zu beiden Proben
- Analyse der Zellen mittels Durchflusszytometrie; die Proben können vor der Analyse bis zu 24 Stunden im Dunkeln bei +4-8°C gelagert werden

Die Auswertung der durchflusszytometrisch gewonnenen Daten erfolgte mit Hilfe der Software WinMDI 2.9. Es wurden Dot-Plots erstellt. Um die DC-Subpopulationen zu identifizieren, wurden entsprechende Gates gesetzt. Durch die Kombination der Gates konnte anhand einer vorgegebenen Formel die absolute Anzahl an vorhandenen MDC1, MDC2 und PDC der jeweiligen Probe berechnet werden. Die Formel lautet:

$$x = \frac{(\%Gated\ Sample - \%Gated\ Control) * absolute\ Leukozytenzahl}{100}$$

x ist hierbei die absolute Anzahl an dendritischen Zellen der entsprechenden DC-Subpopulation pro ml Blut.

Die Referenzwerte aus der Literatur für die einzelnen Subpopulationen der dendritischen Zellen sind der Tabelle 4, wie von Miltenyi Biotec angegeben, zu entnehmen. Nach der Messung und Auswertung wurden die Daten auf Plausibilität untersucht. In einigen Fällen war aufgrund einer erhöhten Zahl von toten Zellen bzw. Debris in der Probe die Gatesetzung schwierig bzw. unmöglich, so dass hier falsch hohe bzw. falsch niedrige DC-Populationen berechnet wurden. In diesen Fällen (definiert als Abweichung der Zellzahlen > 10-fach der Norm) wurden die Werte aus der Kalkulation entnommen. Im Ergebnisteil ist jeweils die Zahl der Messungen für die verschiedenen Gruppen angegeben.

	% an Leukozyten (Spannweite)	Absolute Zellzahl pro ml Blut (Spannweite)
MDC1	0,27 % (0,09 - 0,42 %)	$1,56 \times 10^4$ ($6,58 \times 10^3$ - $3,28 \times 10^4$)
MDC2	0,02 % (0 - 0,04 %)	$8,60 \times 10^2$ (0 - $2,16 \times 10^3$)
PDC	0,19 % (0,09 - 0,37 %)	$1,12 \times 10^4$ ($4,51 \times 10^3$ - $2,04 \times 10^4$)

Tabelle 4: Literaturwerte für DC-Subpopulationen im DC-EK laut Hersteller

3.1.12 Dot-Plot-Beispiele für die Auswertung des Blood Dendritic Cell Enumeration Kits

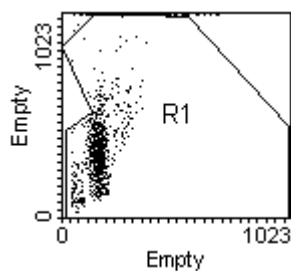
Die Gatesetzung wurde nach Anleitung des DC-EK von Miltenyi Biotec durchgeführt. Die Gatesetzung dient dem Ausschluss anderer Zellpopulationen, sodass letztendlich nur dendritische Zellen erfasst werden. Die Werte der Isotypantikörper wurden von den Anti-BDCA-Daten subtrahiert, um die absolute Zahl der DC-Populationen berechnen zu können.

Beispiel für die Auswertung des Blood Dendritic Cell Enumeration Kits

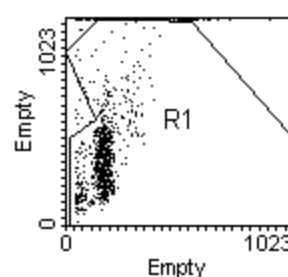
(Messung bei einem Typ 1 Diabetiker)

1. R1 diente dem Ausschluss von Zellschutt und Thrombozyten. Die ausgeschlossenen Zellen lagen außerhalb des Gates. FSC wurde auf der X-Achse und SSC auf der Y-Achse aufgetragen. Innerhalb von R1 befanden sich Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten und dendritische Zellen.

Anti-BDCA Cocktail

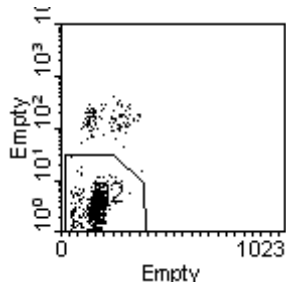


Control Cocktail

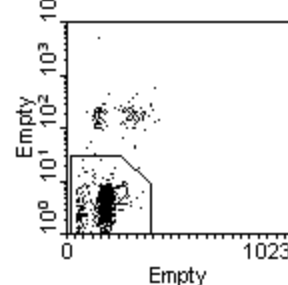


2. Nach Abzug der von R1 ausgeschlossenen Zellen wurde R2 gesetzt. R2 dient dem Ausschluss von B-Zellen, Monozyten, Granulozyten (eosinophile und neutrophile Granulozyten) und toten Zellen. Die ausgeschlossenen Zellen liegen außerhalb des Gates. SSC (X-Achse) wurde gegen Fluoreszenz-3 (Y-Achse) aufgetragen.

Anti-BDCA Cocktail

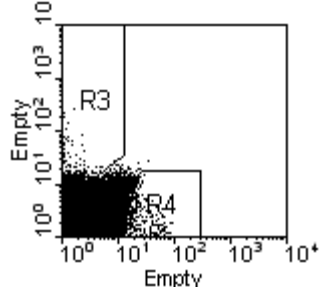


Control Cocktail

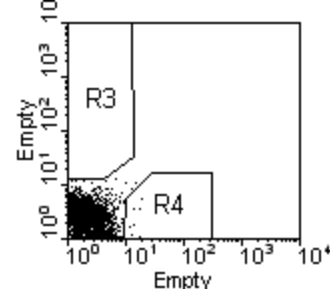


3. Bestimmung der CD1c-positiven-(BDCA-1⁺) MDC1 durch R3 und der BDCA-2-positiven PDC durch R4. Fluoreszenz-1 (X-Achse) wurde gegen Fluoreszenz-2 (Y-Achse) aufgetragen. Dabei wurden jene Zellen, welche außerhalb von R1 und R2 lagen, ausgeschlossen.

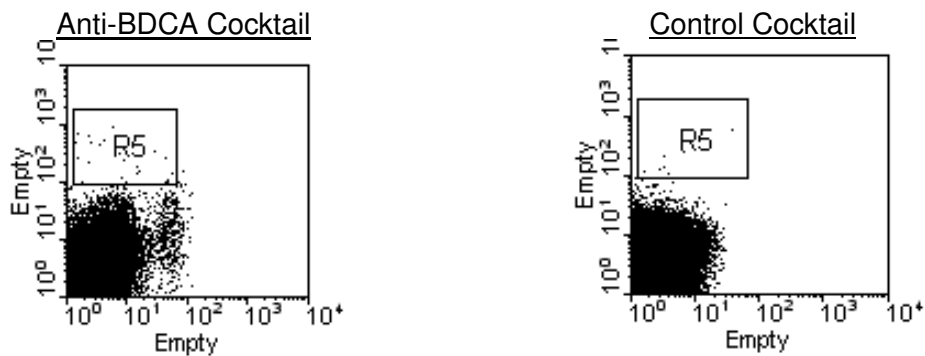
Anti-BDCA Cocktail



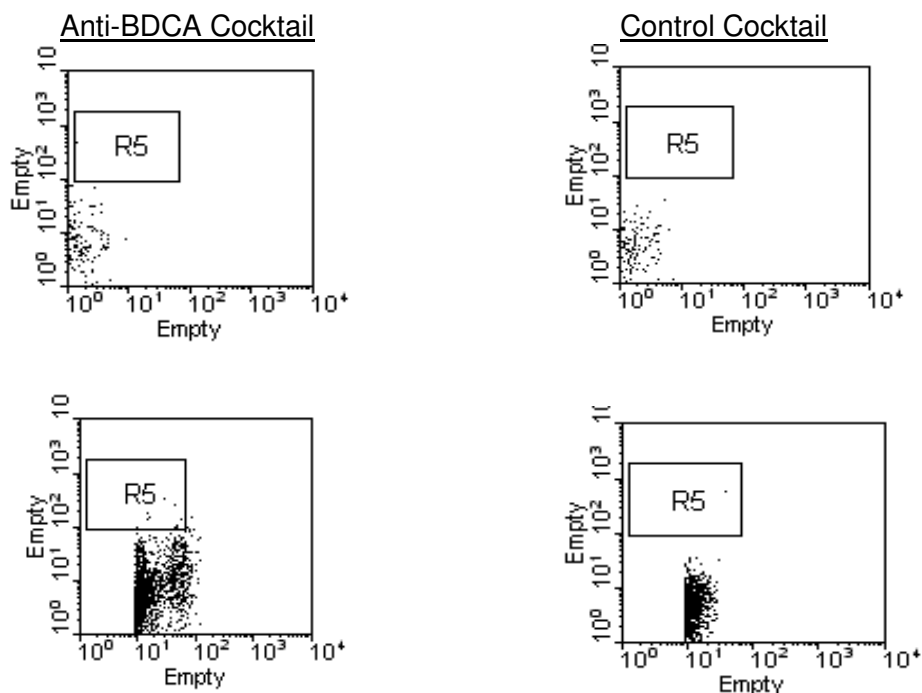
Control Cocktail



4. Anschließend erfolgte die Bestimmung der BDCA-3-positiven MDC2 durch R5. Hierbei wurden nur Events mit einem starken FL-4 Signal erfasst, um keine Monozyten, Granulozyten, PDC oder MDC1 zu werten. Auch hier wurden die außerhalb der vorher gesetzten Gates liegenden Zellen bereits im Voraus ausgeschlossen.



5. Erfassung der MDC2. Fluoreszenz-1 (X-Achse) wurde gegen Fluoreszenz-4 (Y-Achse) aufgetragen. Die Gates R1, R2 und R3 wurden in die Erstellung des ersten Bildes miteinbezogen. Im zweiten Bild wurden R1, R2 und R4 verwendet.



3.1.13 Durchführung eines TLR-Stimulations-Assays

Um die Frage zu klären, ob die dendritischen Zellen von Diabetikern unterschiedlich auf Stimulation mit TLR-Liganden reagieren, wurde ein Vollblut-Stimulations-Assay durchgeführt. Zur Durchführung des Vollblut-Assay wurde zunächst die Leukozytenzahl der Blutproben anhand eines kleinen Blutbildes im Zentrallabor ermittelt. Orientierend an einem bereits bestehendem Protokoll wurde die Menge des zu verwendenden heparinisierten Vollblutes auf 10.000 Leukozyten/100µl normiert (Summers 2006). Das Heparinblut wurde mit RPMI-Medium auf ein Gesamtvolumen von 600 µl eingestellt (entspricht 60.000 Leukozyten). Nach der Zugabe der Stimulantien (siehe Tabelle 5) wurden die Zellen über 5 Tage im Zellkulturschrank bei +37° Celsius und 5% Kohlendioxid aufrecht in offenen 1,5 ml-Tubes kultiviert. Als Negativkontrolle wurde ein Blut-RPMI-Ansatz ohne Stimulans verwendet.

Stimulans (TLR Ligand)	Konzentration
FSL-1 (TLR2/TLR6)	1µg/ml
PIC (TLR3)	1µg/ml
LPS (TLR4)	10 ng/l
Flagellin (TLR5)	0,1 µg/ml = 100 ng/ml
CL097 (TLR7/TLR8)	500 µg/ml

Tabelle 5: Verwendete Stimulantien des Vollblut-Assay

In der linken Spalte folgt eine Auflistung der verwendeten Stimulantien. In Klammern ist die jeweilige Funktion des Stimulans angegeben und zeigt an welchen Toll-ähnlichen Rezeptor es bindet. In der rechten Spalte wird die Konzentration der verwendeten Stimulantien pro ml Medium angegeben.

Pro Stimulans und Kontrolle wurden je fünf Eppendorfröhrchen (Tubes) angesetzt. Täglich wurde von jedem Stimulans ein Röhrchen abzentrifugiert (200g, 10 min bei +4°C), der Überstand abgenommen und dieser bei -80° Celsius bis zur Zytokin-, bzw. Chemokinmessung eingefroren.

Toll-like Rezeptor	Funktion
TLR2	erkennt Lipoteichonsäure auf grampositiven Bakterien und Lipoproteine auf gramnegativen Bakterien
TLR3	erkennt doppelsträngige RNA (dsRNA) von Viren
TLR4	erkennt bakterielle Lipopolysaccharide
TLR5	erkennt das Flagellinprotein bakterieller Flagellen
TLR6	erkennt in Interaktion mit TLR2 bakterielle Lipoproteine
TLR7	erkennt virale Einzelstrang-RNA in Endosomen
TLR8	erkennt Guanosin-Analoga
TLR9	Erkennt CpG-Motive (bakterielle und virale DNA)
TLR10	Nicht bekannt

Tabelle 6: Funktion verschiedener Toll-like Rezeptoren (TLR)

In Bezug auf den Review von Kawai und Akira 2006 (Kawai 2006)

3.1.14 Messung von Zytokinen und Chemokinen im Zellkulturüberstand mittels ELISA

Das Akronym ELISA steht für Enzyme-linked immunosorbent assay. Verwendet wurde ein sogenannter Sandwich-ELISA (Murphy 2009). Hierbei wird eine Kunststoffplatte mit dem Capture Antibody (CAb; „Fang-Antikörper“), einem antigenspezifischen Antikörper, beschichtet. Anschließend erfolgt die Zugabe des Antigens, im vorliegenden Falle Zellkulturüberstand. Das Antigen wird vom CAb gebunden. Ungebundener oder unspezifisch gebundener CAb wird im nächsten Schritt ausgewaschen. Nun folgt die Beschichtung der Platte mit dem Detection Antibody (DAb; „Erkennungs-Antikörper“), der an ein zweites Epitop des Antigens bindet (Porstmann 1992). An den DAb ist das Enzym Peroxidase gekoppelt. Unter Zugabe einer farblosen Substratlösung, hier Substrate Solution, wandelt das Enzym das Substrat mittels einer enzymatischen Reaktion in ein farbiges Produkt um, dessen Absorption (optische Dichte) in einem Photometer bestimmt werden kann. Auf jeder Platte wird ein Standard mitgeführt, welcher die Zytokinkonzentration und somit die Farbintensität zur entsprechenden optischen Dichte festlegt. Anhand dieser Standardkurve kann die Zytokin-/Chemokinkonzentration quantifiziert werden. Für jede Probe und den

Standard wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Der Überstand wurde wie unter 3.1.13 beschrieben anhand des Vollblut-Assays gewonnen. Zur Messung wurden kommerziell erhältliche ELISA-Kits (DuoSet ELISA von R&D Systems) verwendet. Aufgrund der begrenzten Probenvolumina konnten nur fünf ausgewählte Zytokine/Chemokine analysiert werden (IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF- α , CCL-18). Primär wurden die proinflammatorischen Marker getestet. Sofern noch Proben vorhanden waren, wurde das antiinflammatorische Zytokin IL-10 gemessen (n= 3-5 Proben).

Der genaue Arbeitsablauf ist im nachfolgenden Protokoll aufgeführt. Die Zusammensetzung der im ELISA verwendeten Substanzen finden sich im Anhang A.

Protokoll für DuoSet Elisa (R&D Systems)

Präparation der Platte

- Beschichtung der ELISA-Platte mit je 100 μ l des Capture Antibody (CAb) pro Well (Vertiefung der ELISA-Platte). Dazu wird der CAb von seiner ursprünglichen Konzentration auf die Arbeitskonzentration verdünnt.
- Versiegeln der Platte mit einem Kunststoffdeckel und Inkubation derselbigen über Nacht bei Raumtemperatur für ca. 15 Stunden (Titramax-Schüttler mit 600 rpm).
- Kräftiges Auskippen des CAb. Anschließend waschen der Platte mit Waschpuffer. Dabei jedes Well mit 300 μ l Waschpuffer füllen, den Waschpuffer kräftig ausschütten und die Platte anschließend auf einem Papiertuch ausklopfen, so dass sich keine Flüssigkeit mehr in den Wells befindet. Insgesamt drei Mal waschen.
- Blocken der Platten durch Zugabe von 300 μ l Reagent Diluent (RD) auf jedes Well. Danach Inkubation der Platte für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur (Titramax-Schüttler mit 600 rpm).
- Wiederholung des Waschschrilles mit Waschpuffer.
- 100 μ l Probe oder Standard (gelöst in RD) pro Well hinzufügen. Alle Proben, Standards, sowie den Blank als Doppelbestimmung ansetzen. Der Blank gibt den Nullwert der Standardkurve für die optische Dichte vor. Für ihn wird 100 μ l reines RD verwendet. Platte versiegeln und bei Raumtemperatur zwei Stunden inkubieren (Titramax-Schüttler mit 600 rpm).
- Wiederholung des Waschschrilles mit Waschpuffer.

- Hinzugabe von 100 µl Detection Antibody (DAb) (gelöst in RD) pro Well. Die Platte erneut versiegeln und nochmals für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubieren (Titramax-Schüttler mit 600 rpm).
- Wiederholung des Waschschrilles mit Waschpuffer.
- Zugabe von 100 µl der Arbeitskonzentration von Streptavidin-HRP auf jedes Well. Anschließend versiegeln der Platte und Inkubation dieser für 20 Minuten bei Raumtemperatur (Titramax-Schüttler mit 600 rpm).
- Wiederholung des Waschschrilles mit Waschpuffer
- Zugabe von 100 µl Substrate Solution auf jedes Well. Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Direkte Lichteinstrahlung vermeiden.
- Zugabe von 50 µl Stop Solution pro Well. Die Platte sanft schwenken, um eine gute Vermischung sicherzustellen.
- Innerhalb der nächsten 30 Minuten: Messung der Optischen Dichte (OD) der Wells mithilfe eines ELISA-Readers bei einer Wellenlänge von 450 nm.

3.2 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software PASW Statistics, Version 18.0. Primär wurden der Kolmogorov-Smirnov-Test und der Shapiro-Wilk-Test zur Überprüfung der Daten auf Normalverteilung verwendet. Ihnen liegt die Theorie zugrunde, dass eine Variable in einer mittels Stichprobe erfassten Population normalverteilt ist. Die getesteten Daten galten ab einem p-Wert >0.05 als normalverteilt und bei einem p-Wert <0.05 als nicht normalverteilt. Ebenso wurde der Levene-Test zur Prüfung der Daten auf Homogenität ihrer Varianzen durchgeführt. Bei $p>0.05$ galten die Varianzen als homogen verteilt, bei $p<0.05$ nicht (Field 2009). Da sich fast alle Daten als nicht normalverteilt darstellten, wurden weitere Analysen mit nicht-parametrischen Tests durchgeführt. Dabei wurden folgende Tests verwendet: Kruskal-Wallis-Test zur Untersuchung unabhängiger Gruppen auf Differenzen und Mann-Whitney-Test als Post-Hoc-Test zum Kruskal-Wallis-Test unter

Berücksichtigung der Bonferroni-Korrektur². Der Kruskal-Wallis-Test ist eine nicht parametrische Variante des ANOVA-Tests und dient dem Vergleich verschiedener unabhängiger Gruppen auf Unterschiede (Field 2009). Weiterhin wurden deskriptive Häufigkeitsverteilungen angefertigt. Da die Patientenzahl in der Gestationsdiabetikerinnen-Gruppe beim DC-EK zu gering war, um sie statistisch auszuwerten ($n=3$), wurden nur die Gruppen der Typ 1 Diabetiker, der Typ 2 Diabetiker und der Kontrollen miteinander verglichen. In den deskriptiven Häufigkeitstabellen werden die Gestationsdiabetikerinnen mitaufgeführt. Dargestellt sind die Ergebnisse als Mittelwert \pm SEM oder als Mittelwert \pm SD. Dies wird jeweils bei den Abbildungen angegeben. In den Box-Plot-Abbildungen wird der Median und die 25./75.Perzentile sowie SEM dargestellt.

Die Graphiken wurden mit PASW Statistics 18.0 (IBM Corporation, Somers, NY) und Excel 2010 (Microsoft, Seattle, WA) erstellt.

3.2.1 Verwendete Hypothesen

Als Nullhypothese wurde angenommen, dass kein Unterschied (bzw. Normalverteilung; Homogenität der Varianzen) zwischen den Patientengruppen besteht. Die Alternativhypothese besagte, dass es einen Unterschied (bzw. Nicht-Normalverteilung; Inhomogenität der Varianzen) zwischen den einzelnen Gruppen gibt. Ab einem Wert von $p < 0.05$ bestand eine Signifikanz, die Nullhypothese wurde verworfen und die Alternativhypothese angenommen. Wenn die p -Werte > 0.05 lagen, waren keine signifikanten Unterschiede vorhanden und die Nullhypothese wurde beibehalten.

² Bonferroni-Korrektur: Sie wird zur Vermeidung eines Typ I Fehlers angeschlossen, sodass der p -Wert für den Post-Hoc Mann-Whitney-Test nun nicht mehr 0.05 beträgt, sondern abhängig von der Anzahl der durchgeführten Mann-Whitney-Tests ist. Ein Typ I Fehler ist die Annahme, dass ein echter Effekt in einer Population besteht, wenn in Wirklichkeit keiner vorhanden ist.

$$p = \frac{0.05}{\text{Anzahl der verwendeten Mann – Whitney – Tests}}$$

3.2.2 Empirische Fragestellung

Es wurde angenommen, dass es einen Unterschied zwischen den Patientengruppen hinsichtlich der Größe ihrer DC-Subpopulationen, ihrer Zytokinexpression im zeitlichen Verlauf unter verschiedenen Stimulantien und der Expressionsquantität sowie –qualität ihrer Oberflächenantigene gibt. Das Hauptinteresse galt hierbei der Gruppe der Typ 1 Diabetiker. Es wurde die Theorie aufgestellt, dass Typ 1 Diabetiker eine andersartige Aufteilung der DC-Subpopulationen im Vergleich zu Kontrollen und Typ 2 Diabetikern haben. Für typische Oberflächenantigene dendritischer Zellen und das Zytokin-/Chemokin-expressionsmuster wurden ebenfalls Unterschiede bei Typ 1 Diabetikern im Vergleich zu Kontrollen erwartet.

4 Ergebnisse

4.1 Messung der DC-Subpopulationen im Vollblut mittels Enumeration Kit (DC-EK)

Im Blood Dendritic Cell Enumeration Kit (DC-EK) fand sich bei der Analyse der DC-Subpopulationen in allen Patientengruppen die höchste Zellzahl für MDC1 gefolgt von PDC und MDC2 (Abbildung 8). Bei den gesunden Kontrollen stellten die PDC die größte Population dar.

Jede Subpopulation wies innerhalb einer Patientengruppe eine große Spannweite auf. So wurde in der Kontrollgruppe im Mittel 28371 ± 7398 (SEM) MDC1 pro ml Vollblut gemessen, bei den Typ 2 Diabetikern fanden sich im Mittel 58379 ± 19872 MDC1 pro ml Blut. Für MDC2 bewegten sich die Zellzahlen zwischen 260 ± 260 (GDM) und 4781 ± 3299 (T1DM), für PDC zwischen 5637 ± 5637 (GDM) und 27788 ± 12025 (Kontrollen) (Abbildung 9). Im DC-EK waren die Ergebnisse nicht normalverteilt. Im Kruskal-Wallis-Test zeigten sich für die Größe der Populationen von MDC1, MDC2 und PDC keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen der Typ 1 Diabetiker, Typ 2 Diabetiker und den Kontrollen mit $H(2) = 0.54$ für MDC1, $H(2) = 0.36$ für MDC2 und $H(2) = 0,46$ für PDC³. Nach Berechnung der Effektgröße r zwischen den Gruppen Typ 1 Diabetes, Typ 2 Diabetes, GDM und Kontrollen zeigten sich Werte nahe Null (zwischen -0,02 und -0,2), so dass der Effekt der Typangehörigkeit auf die Größe der DC-Subpopulation vernachlässigbar war. Lediglich für MDC2 zeigte sich für die Typ 1 Diabetiker im Vergleich mit Typ 2 Diabetikern und Gestationsdiabetikerinnen ein mittlerer Effekt mit $r = -0,33$ und $-0,50$, sowie für T1DM im Vergleich zu T2DM für PDC mit $r = -0,33$.

Auch nach Berechnung der absoluten DC-Werte pro 10^6 Leukozyten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Tabelle 7). Werte, die >5-fach über dem Gruppenmittelwert lagen, wurden von der Analyse und den Abbildungen ausgeschlossen.

³ H steht für den Kruskal-Wallis-Test. Seine Freiheitsgrade sind in Klammern angegeben.

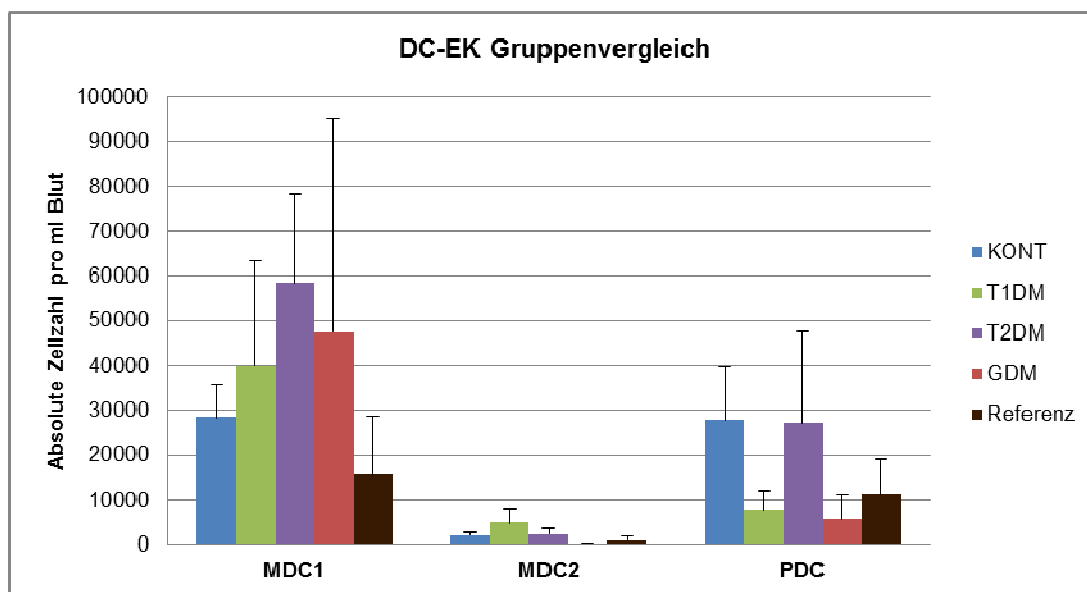


Abbildung 8: Mittelwerte der DC-Subpopulationen in den verschiedenen Patientengruppen und der Kontrollgruppe gemessen mittels DC-EK

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM als absolute Zellzahl pro ml Blut. KONT=Kontrolle (n=24), T1DM=Typ 1 Diabetiker (n=9), T2DM=Typ 2 Diabetiker (n=10), GDM=Gestationsdiabetikerinnen (n=8); MDC1 = myeloide DC Typ 1; MDC2= myeloide DC Typ 2; PDC = plasmazytoide DC. Die Referenz entspricht den Literaturwerten für gesunde Personen.

	Leukozyten*	MDC1	MDC2	PDC
	MW \pm SEM	MW \pm SEM	MW \pm SEM	MW \pm SEM
KONT	6,12 \pm 0,28	28371 \pm 7398	2027 \pm 616	27789 \pm 12025
T1DM	6,2 \pm 0,42	39880 \pm 23443	4782 \pm 3299	7672 \pm 4368
T2DM	6,94 \pm 0,45	58379 \pm 19872	2348 \pm 1236	27259 \pm 20423
GDM	9,0 \pm 0,72	47580 \pm 47580	260 \pm 260	5637 \pm 5637

Tabelle 7: Gruppenvergleich der Mittelwerte der DC-Subpopulationen in den verschiedenen Patientengruppen und der Kontrollgruppe gemessen mit dem DC-EK

Es fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. MW= Mittelwert; (\pm)SEM= Standardfehler; Werte in absoluter Zellzahl angegeben pro 1.000.000 Leukozyten. KONT=Kontrolle (n=24), T1DM=Typ 1 Diabetiker (n=9), T2DM=Typ 2 Diabetiker (n=10), GDM=Gestationsdiabetikerinnen (n=8); MDC1 = myeloide DC Typ 1; MDC2= myeloide DC Typ 2; PDC = plasmazytoide DC. * Absolute Leukozytenzahl $\times 10^6$

Der Median mit 25./75. Perzentile der Zellzahlbestimmung für die einzelnen DC-Subpopulationen ist in Abbildung 9 bis Abbildung 14 dargestellt. Es zeigt sich der Trend zu höheren Zellzahlen an MDC1 bei gleichzeitig etwas niedrigeren Zellzahlen für die MDC2 bei Typ 1 Diabetikern. Die PDC waren in allen Patientengruppen etwas niedriger im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen (nicht signifikant).

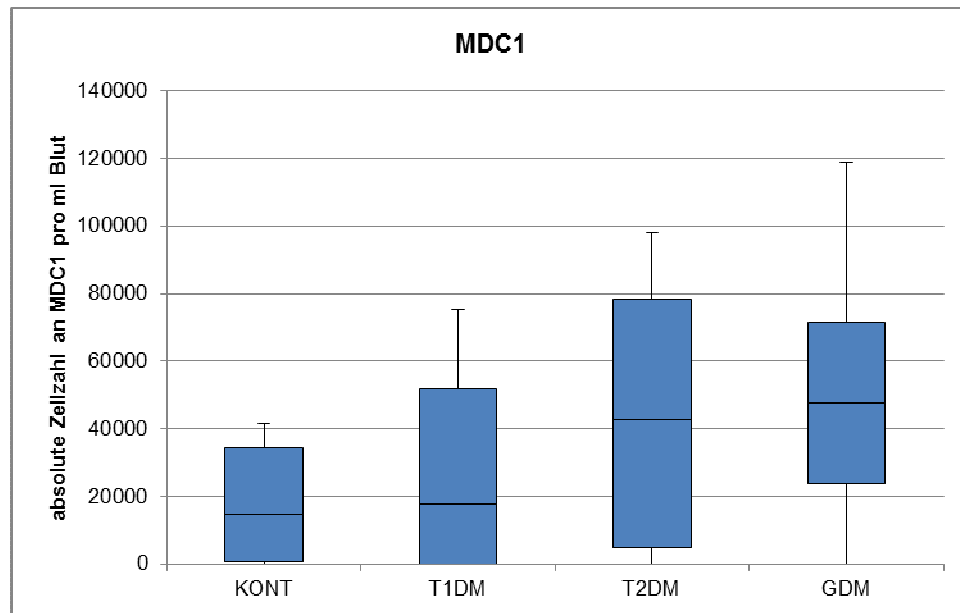


Abbildung 9: Zellzahl der myeloiden dendritischen Zellen Typ 1 (MDC1) pro ml Blut in den verschiedenen Gruppen

Dargestellt ist der Median (25./75. Perzentile) \pm SEM. KONT=Kontrolle (n=24), T1DM=Typ 1 Diabetiker (n=9), T2DM=Typ 2 Diabetiker (n=10), GDM=Gestationsdiabetikerinnen (n=8).

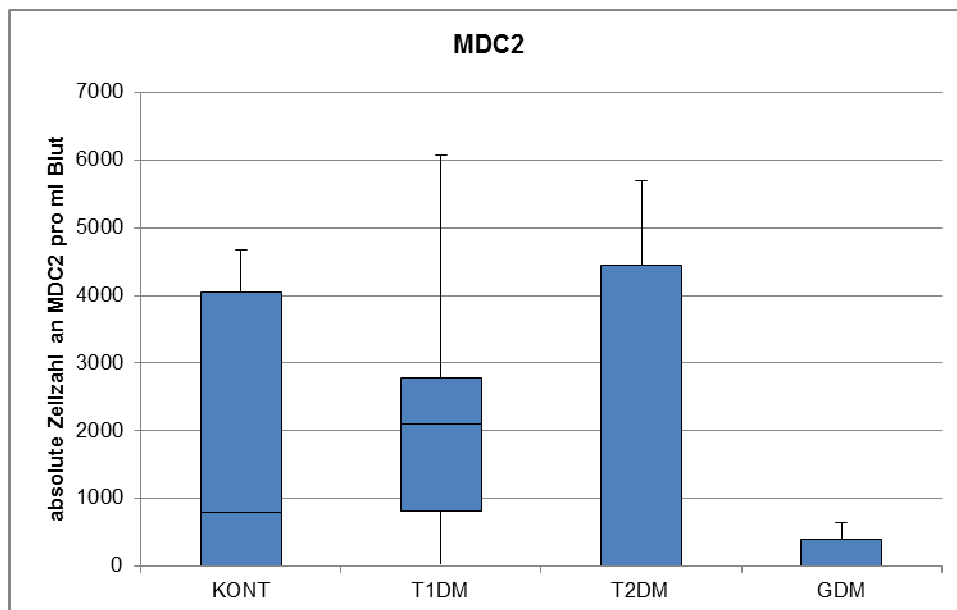


Abbildung 10: Zellzahl der myeloiden dendritischen Zellen Typ 2 (MDC2) pro ml Blut in den verschiedenen Gruppen.

Dargestellt ist der Median (25./75. Perzentile) \pm SEM. KONT=Kontrolle (n=24), T1DM=Typ 1 Diabetiker (n=9), T2DM=Typ 2 Diabetiker (n=10), GDM=Gestationsdiabetikerinnen (n=8). Für T2DM und GDM liegt der Median an der unteren Grenze der Box.

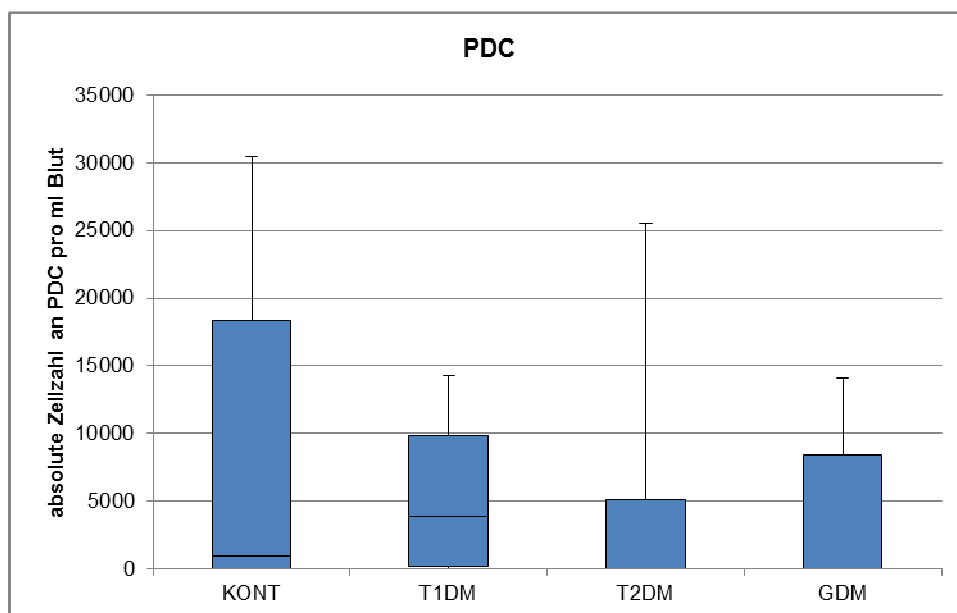


Abbildung 11: Zellzahl der plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDC) pro ml Blut in den verschiedenen Gruppen.

Dargestellt ist der Median (25./75. Perzentile) \pm SEM. KONT=Kontrolle (n=24), T1DM=Typ 1 Diabetiker (n=9), T2DM=Typ 2 Diabetiker (n=10), GDM=Gestationsdiabetikerinnen (n=8). Für T2DM und GDM liegt der Median an der unteren Grenze der Box.

Zur weiteren Veranschaulichung sind in Abbildung 12 bis Abbildung 14 Boxplots der DC-Subpopulationen als prozentualer Anteil der Leukozyten dargestellt. Hierbei war festzustellen, dass Typ 1 Diabetiker zwar leicht erhöhte absolute Zahl an MDC1 pro ml Blut im Vergleich zu den Kontrollen aufweisen, dies aber nicht mehr zu beobachten ist, wenn die Werte auf die Gesamtleukozytenzahl bezogen werden. Bei Typ 2 Diabetikern fand sich eine leichte Erhöhung der MDC1 bezogen auf die Leukozytenzahl. Für alle Patientengruppen war eine nicht signifikante Reduktion der absoluten und relativen Zahl an PDC im peripheren Blut zu beobachten.

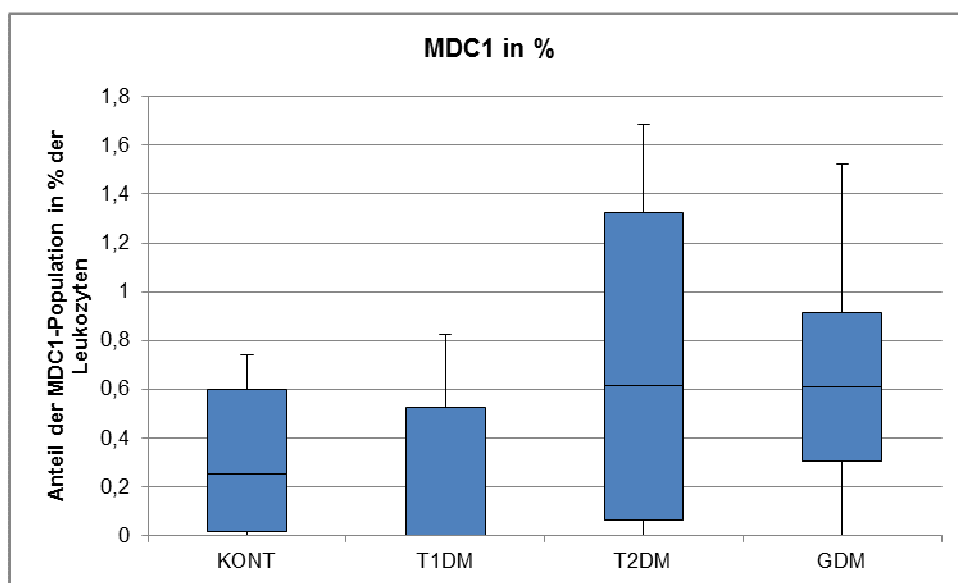


Abbildung 12: Anteil der myeloiden dendritischen Zellen Typ 1 (MDC1) in Prozent [%] der absoluten Leukozytenzahl

Dargestellt ist der Median (25./75. Perzentile) \pm SEM. KONT=Kontrolle (n=24), T1DM=Typ 1 Diabetiker (n=9), T2DM=Typ 2 Diabetiker (n=10), GDM=Gestationsdiabetikerinnen (n=8). Für T1DM liegt der Median an der unteren Grenze der Box.

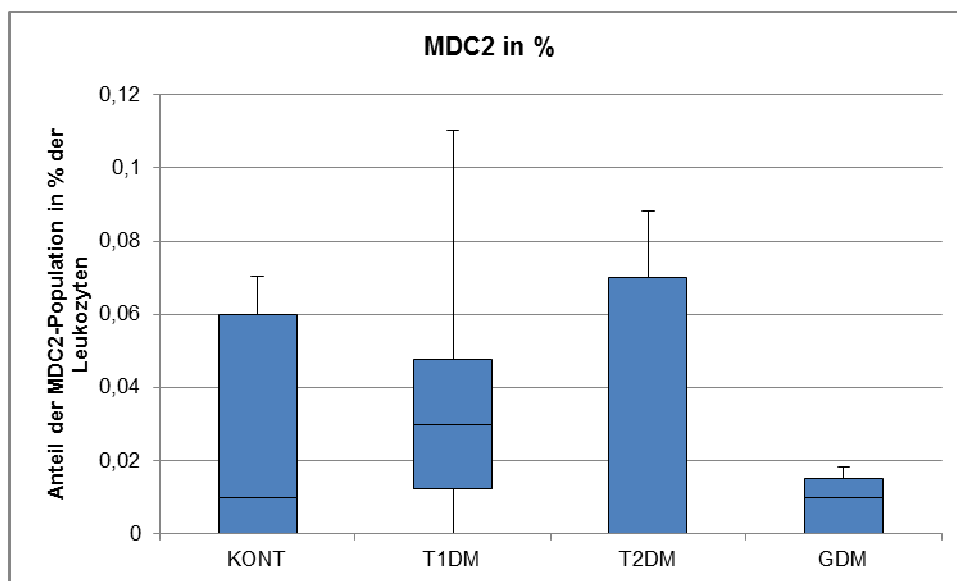


Abbildung 13: Anteil der myeloiden dendritischen Zellen Typ 2 (MDC2) in Prozent [%] der absoluten Leukozytenzahl

Dargestellt ist der Median (25./75. Perzentile) \pm SEM. KONT=Kontrolle (n=24), T1DM=Typ 1 Diabetiker (n=9), T2DM=Typ 2 Diabetiker (n=10), GDM=Gestationsdiabetikerinnen (n=8). Für T2DM liegt der Median an der unteren Grenze der Box.

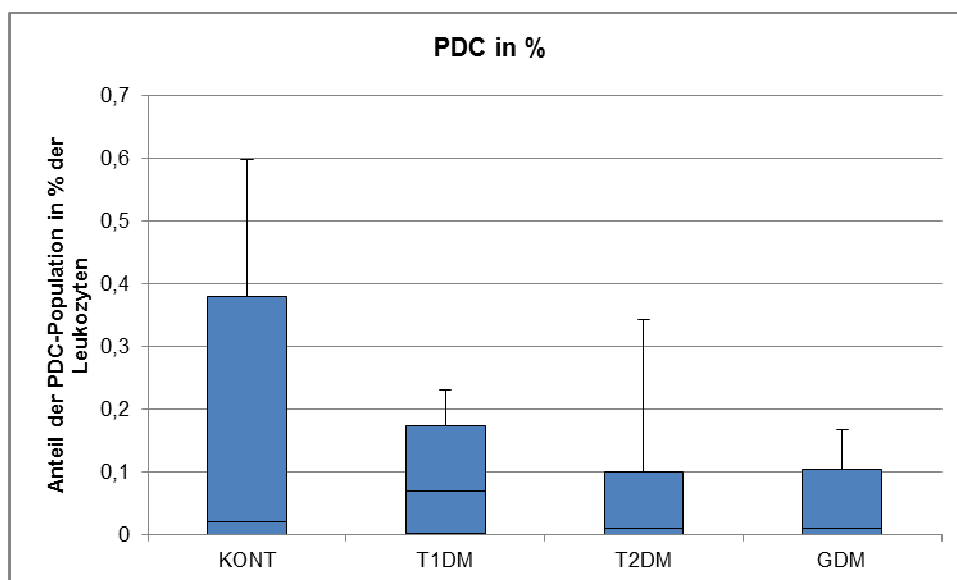


Abbildung 14: Anteil der plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDC) in Prozent [%] der absoluten Leukozytenzahl

Dargestellt ist der Median (25./75. Perzentile) \pm SEM. KONT=Kontrolle (n=24), T1DM=Typ 1 Diabetiker (n=9), T2DM=Typ 2 Diabetiker (n=10), GDM=Gestationsdiabetikerinnen (n=8).

4.2 Analyse der dendritischen Zellen nach Kultivierung (FACS-Daten)

Zu Beginn der Kultivierung humaner dendritischer Zellen wurden unterschiedliche Medienzusammensetzungen, welche bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben worden waren, getestet (Romani 1994; Gill 2002). Es zeigte sich, dass humane dendritische Zellen mit dem Medium X-Vivo nicht in ausreichender Zahl wuchsen, um eine durchflusszytometrische Untersuchung anzuschließen. Die besten Ergebnisse hinsichtlich Zellzahl und Reinheit dendritischer Zellen wurden mit der Kultivierung in RPMI-1640, 2 % humanem AB-Serum (hABS), IL-4 (500 U/ml) und IFN- α (20 ng/ml) über 5 Tage mit anschließender Zugabe von TNF- α (20 ng/ml) über weitere 24 Stunden erzielt. Diese Kultivierung wurde anschließend für die Experimente eingesetzt.

4.2.1 Analyse der Reinheit der DC-Population durch FACS

Nach der Kultivierungsphase von 6 Tagen wurden die kultivierten Zellen geerntet und mittels FACS-Analyse untersucht. Verwendet wurden Marker für Monozyten (CD14), B-Zellen (CD19), T-Zellen (CD3), NK-Zellen (CD16, CD56) und dendritische Zellen (CD11c, CD83, CD123, CD209, BDCA-1, BDCA-4) sowie für kostimulierende Moleküle als Messparameter für die Aktivierung der DC (CD80, CD86). In Abbildung 15 und Abbildung 16 sind charakteristische Bilder einer FACS-Analyse dargestellt. In Abbildung 15 wird gezeigt wie die Gates in der FACS-Analyse gesetzt wurden, um eine reine DC-Population zu erhalten.

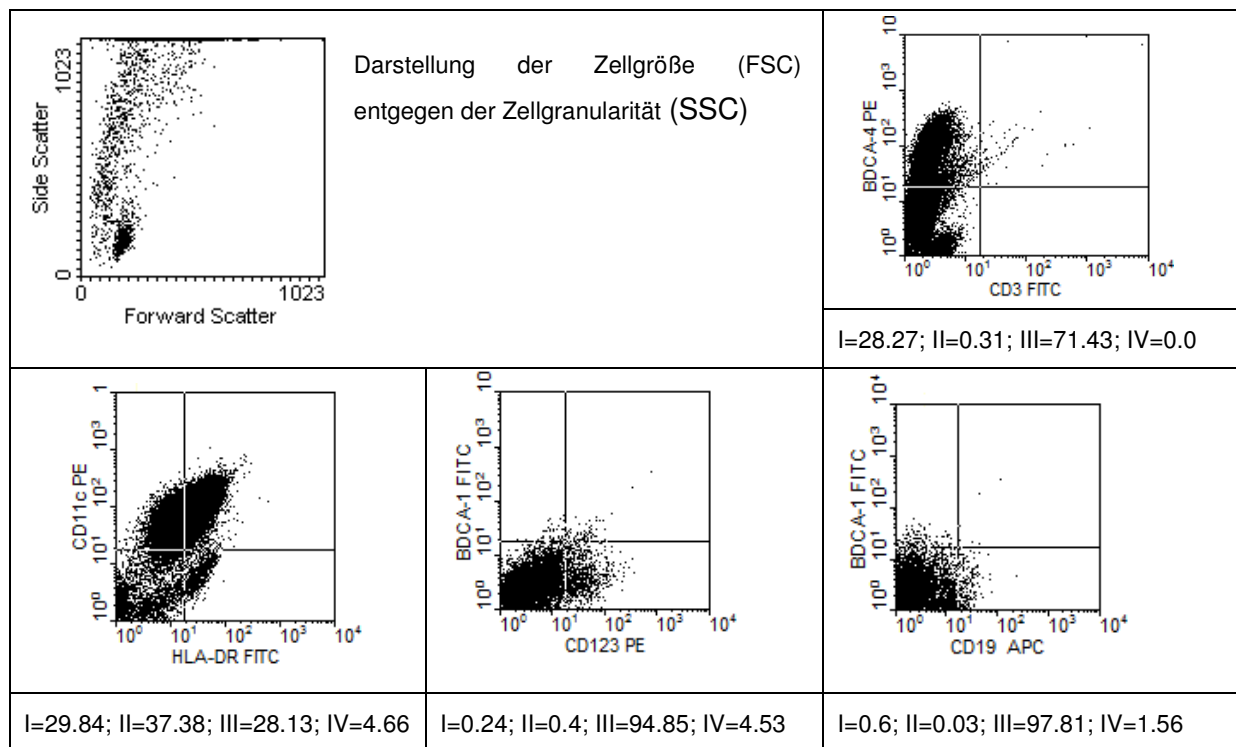


Abbildung 15: Expressionsraten spezifischer Oberflächenmarker der kultivierten dendritischen Zellen am Beispiel eines Typ 1 Diabetikers

Die Ziffern I-IV bezeichnen die Quadranten des Dot-Plots wie in **Abbildung 7** angegeben. Dabei galten Zellen, welche sich im Quadranten I befanden als positiv für das auf der Y-Achse dargestellte Oberflächenantigen. Zellen im Quadrant IV waren positiv für das auf der X-Achse aufgetragene Oberflächenantigen. Zellen im Quadrant II waren positiv für beide getesteten Oberflächenantigene („doppelt positiv“ genannt). Zellen im Quadrant III waren doppelt negativ, das heißt, sie trugen keines der getesteten Antigene auf ihrer Oberfläche.

Bei den Messungen zeigte sich, dass nach der *in vitro* Kultivierung eine relativ reine DC-Population gewonnen werden konnte. Die Kontamination mit anderen Zellpopulationen war gering. Die Zellzahl von CD3-positiven T-Zellen lag $<1,6 \pm 0,09\%$, CD19-positiven B-Zellen $<7,7 \pm 4,9\%$, CD56-positive Zellen (NK-Zellen) $<9,5 \pm 13,5\%$ und CD16-positive Zellen (NK-Zellen, Monozyten, Makrophagen) $<5,3 \pm 8,1\%$. CD14-positive Monozyten waren in einer Prävalenz von $22,9 \pm 9,2\%$ vorhanden.

Bei den Patienten zeigte sich folgendes Expressionsmuster der dendritischen Zellen:

MDC1+2 (CD11c⁺⁺): Typ 1 Diabetes $59,6 \pm 14,6\%$ versus Typ 2 Diabetes $35,4 \pm 18,3\%$ versus gesunde Kontrollen $50,5 \pm 13,5\%$

PDC (BDCA-4⁺⁺/CD123⁺⁺): Typ 1 Diabetes $40,3 \pm 7,9\%$ / $10,2 \pm 3,4\%$ versus Typ 2 Diabetes $49,0 \pm 0\%$ / $13,2 \pm 10,5\%$ versus gesunde Kontrollen $29,1 \pm 13,7\%$ / $16,4 \pm 8,3\%$.

In allen vier Patientengruppen waren <10 % der Zellen positiv für die Oberflächenantigene BDCA-1, BDCA-3, CD1a, CD3, CD16, CD19 und CD80. Signifikante Unterschiede in der Prävalenz myeloider (MDC1 und 2) oder plasmazytoider DC waren zwischen den Gruppen nicht zu verzeichnen.

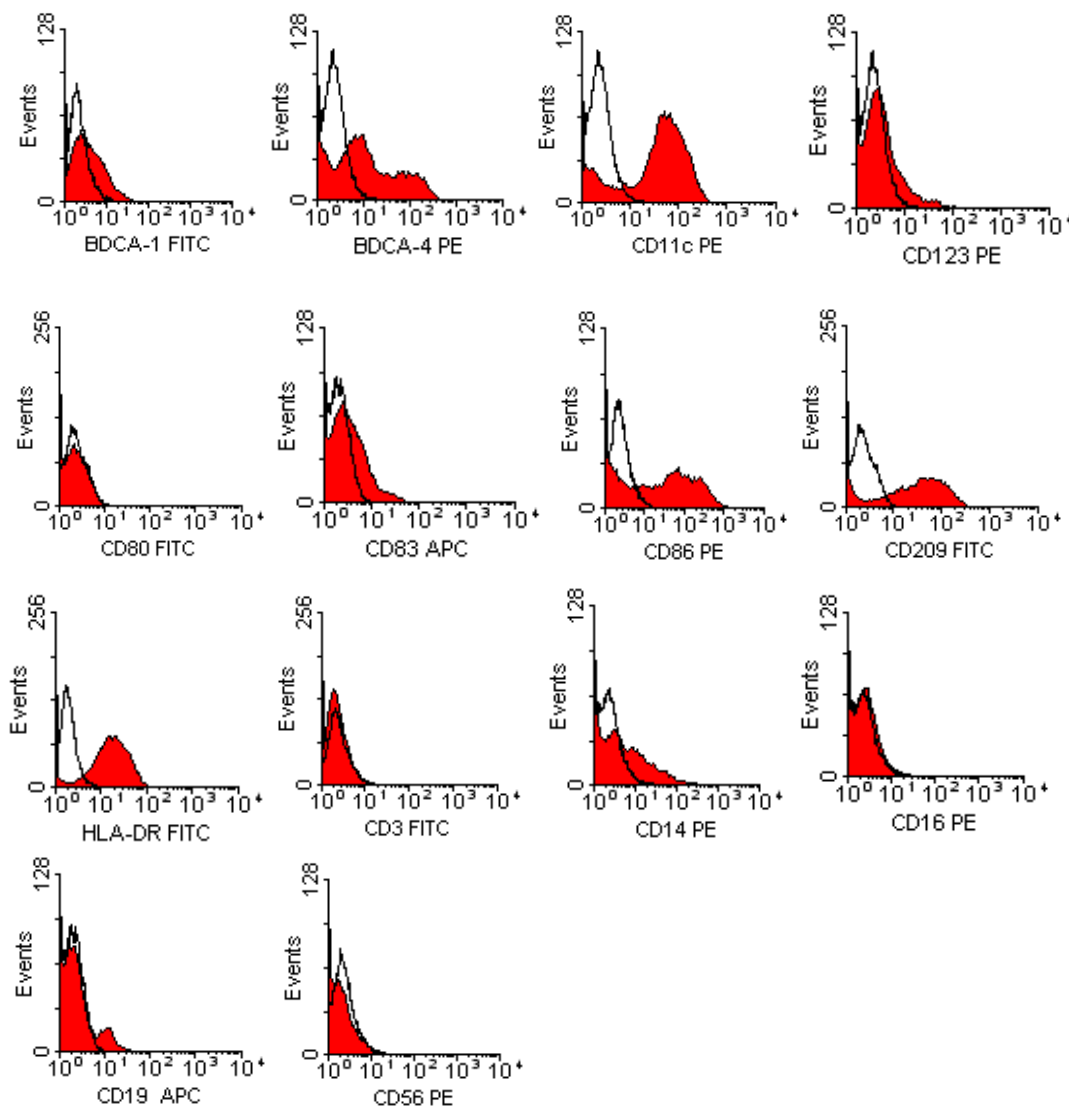


Abbildung 16: Beispiel für den Nachweis von Oberflächenmarkern in der FACS-Analyse von den in Zellkultur isolierten dendritischen Zellen.

DC-spezifische Marker: BDCA-1, BDCA-4, CD11c, CD83, CD123, HLA-DR; T-Zellmarker: CD3; B-Zellmarker: CD19; Monozytenmarker: CD14; Marker für NK-Zellen: CD56; Marker für Monozyten/NK-Zellen/Makrophagen: CD16; Marker für kostimulierende Moleküle: CD80, CD86. Die schwarze Linie stellt die Isotypantikörper dar, die rote Fläche die spezifischen Antikörper.

Abbildung 17 und Tabelle 8 zeigen, dass nach der *in vitro* Isolierung auch keine signifikanten Unterschiede in der Prävalenz von einzelnen Markern myeloider DC (BDCA-1, CD11c) oder plasmazytoider DC (BDCA-4, CD123) bei Typ 1 und Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu den Kontrollpersonen zu verzeichnen war. Interessanterweise war in allen Gruppen die Prävalenz BDCA-4-positiver Zellen (29-40%) wesentlich höher als die BDCA-1-positiver DC (5-9%). Die zusätzliche Analyse von kostimulierenden Molekülen (CD80, CD86), eines DC-spezifischen Lectins (CD209) und von Aktivierungsmolekülen (HLA-DR, CD83) erbrachte keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

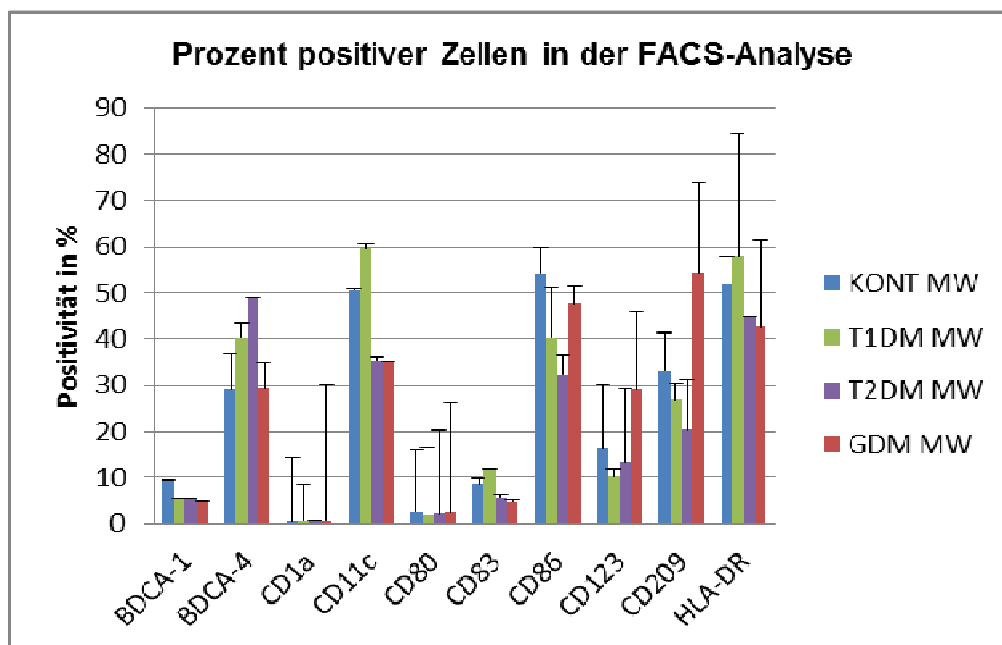


Abbildung 17: Prävalenz DC-spezifischer Marker nach *in vitro* Kultivierung (Prozent der Gesamtzellen)

KONT=Kontrolle (n= 2-18), T1DM=Typ 1 Diabetiker (n= 1-4), T2DM=Typ 2 Diabetiker (n= 1-6), GDM=Gestationsdiabetikerinnen (n= 1-3). Mittelwert \pm SD.

Die nachfolgende Tabelle 8 zeigt eine Aufstellung der FACS-Daten in Prozent Positivität für alle gemessenen Werte.

Mittelwert \pm SD	BDCA-1	BDCA-4	CD1a	CD11c	CD80
Kontrollen	9,44 \pm 7,65	29,12 \pm 13,79	0,60 \pm 0,50	50,56 \pm 13,52	2,59 \pm 11,48
Typ 1 Diabetiker	5,44 \pm 3,18	40,37 \pm 7,94	0,78 \pm 0,88	59,61 \pm 14,67	1,97 \pm 0,20
Typ 2 Diabetiker	5,48*	49,0*	0,72 \pm 0,59	35,41 \pm 18,30	2,09 \pm 0,66
Gestationsdiabetikerinnen	5,01 \pm 5,47	29,28 \pm 29,53	0,83 \pm 0,24	35,02 \pm 23,90	2,40 \pm 0,59

Mittelwert \pm SD	CD83	CD86	CD123	CD209	HLA-DR
Kontrollen	8,73 \pm 5,66	54,21 \pm 13,93	16,41 \pm 8,30	33,16 \pm 5,86	52,01 \pm 11,48
Typ 1 Diabetiker	11,85 \pm 10,70	40,39 \pm 1,69	10,25 \pm 3,50	26,92 \pm 26,52	57,75 \pm 13,68
Typ 2 Diabetiker	5,64 \pm 4,12	32,35 \pm 16,06	13,23 \pm 10,58	20,44 \pm 20,44	44,85 \pm 25,25
Gestationsdiabetikerinnen	4,71 \pm 3,86	47,52 \pm 17,02	29,03 \pm 19,31	54,46 \pm 18,65	42,72*

Tabelle 8: Isolierung dendritischer Zellen in der Zellkultur.

Darstellung der Zahl positiver myeloider (CD11c) und plasmazytoider DC (BDCA4+, CD123+) sowie der Zellen die positiv waren für Aktivierungsmarker CD83/CD86 und HLA-DR.

Kontrolle (n= 2-18), Typ 1 Diabetiker (n= 2-4), Typ 2 Diabetiker (n=1-6), Gestationsdiabetikerinnen (n= 1-3).

* nur bei n= 1 untersucht. Mittelwert \pm SD.

4.2.2 Bestimmung der Expressionsstärke der Oberflächenantigene

Mit der Bestimmung der Fluoreszenzstärke (mean fluorescence intensity) im FACS ist es möglich eine semiquantitative Aussage über die Höhe der Expression (Zahl der Moleküle) eines spezifischen Markers zu treffen. Je intensiver die Fluoreszenz nachweisbar ist, desto stärker ist der Marker auf der Zelloberfläche exprimiert. Wie in Abbildung 18 dargestellt waren keine Unterschiede in der Fluoreszenzintensität zwischen den Gruppen zu beobachten.

Tabelle 9 zeigt eine Aufstellung der mittleren Fluoreszenzintensität für alle gemessenen Oberflächenmarker.

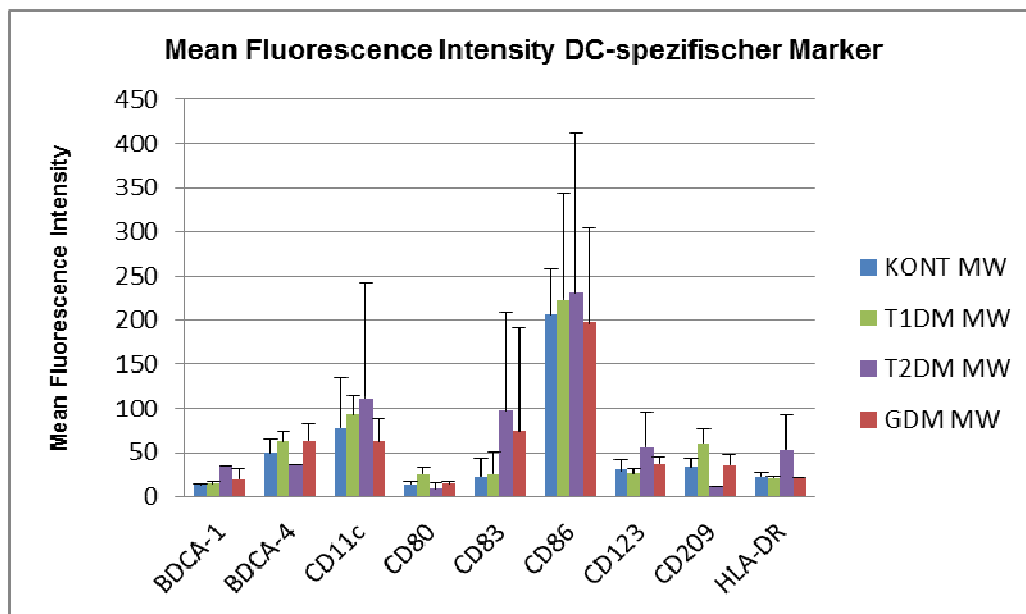


Abbildung 18: Mean Fluorescence Intensity DC-spezifischer Marker nach *in vitro* Kultivierung

KONT=Kontrolle (n= 2-18), T1DM=Typ 1 Diabetiker (n= 1-4), T2DM=Typ 2 Diabetiker (n=1-6), GDM=Gestationsdiabetikerinnen (n= 1-3). Mittelwert \pm SD.

Mittelwert \pm SD	BDCA-1	BDCA-4	CD1a	CD11c	CD80
Kontrollen	13,03 \pm 1,79	49,68 \pm 14,64	18,19 \pm 10,36	78,06 \pm 57,41	13,56 \pm 3,62
Typ 1 Diabetiker	14,69 \pm 2,53	61,82 \pm 12,59	97,64 \pm 94,31	92,48 \pm 21,89	26,26 \pm 5,78
Typ 2 Diabetiker	34,83*	36,31*	12,45 \pm 2,86	111,90 \pm 129,84	8,28 \pm 6,87
Gestationsdiab.	19,66 \pm 11,58	62,59 \pm 20,85	179,64 \pm 284,19	62,37 \pm 25,42	14,70 \pm 2,19

Mittelwert \pm SD	CD83	CD86	CD123	CD209	HLA-DR
Kontrollen	22,87 \pm 20,50	206,07 \pm 52,14	29,66 \pm 12,54	32,85 \pm 10,25	23,02 \pm 4,8
Typ 1 Diabetiker	26,04 \pm 25,61	223,34 \pm 120,05	26,67 \pm 4,89	59,73 \pm 16,59	21,51 \pm 2,09
Typ 2 Diabetiker	97,33 \pm 111,02	230,48 \pm 181,74	56,82 \pm 38,11	11,85*	53,46 \pm 39,38
Gestationsdiab.	74,21 \pm 117,25	196,78 \pm 107,60	36,73 \pm 8,47	35,39 \pm 11,91	21,46*

Tabelle 9: Auflistung der Mean Fluorescence Intensity DC-spezifischer Marker nach *in vitro* Kultivierung

Kontrolle (n= 2-18), Typ 1 Diabetiker (n= 2-4), Typ 2 Diabetiker (n= 1-6), Gestationsdiabetikerinnen (n= 1-3).

* nur bei n= 1 untersucht Mittelwert \pm SD.

4.3 Sekretion von Zytokinen und Chemokinen im Vollblut-Assay

Im Vollblutassay wurde untersucht wie stark mononukleäre Zellen im peripheren Blut auf Stimuli reagieren, welche durch Bindung an unterschiedliche TLR (siehe Tabelle 5) ausgelöst werden. Gemessen wurde die Sekretion proinflammatorischer Zytokine (IL-6, IL-12p70, TNF α), eines antiinflammatorischen Zytokins (IL-10) und des Chemokins CCL-18 über fünf Tage. In den nachfolgenden Abbildungen ist der Zeitverlauf der jeweiligen Zytokin-/Chemokinsekretion angegeben, wobei jeweils die basale Sekretionsrate als Negativkontrolle (Kultivierung des Vollblut-Assays über fünf Tage nur mit RPMI-Medium ohne Stimulans) vom Absolutwert subtrahiert wurde. Dies erklärt, weshalb in den Diagrammen auch negative Werte zu verzeichnen sind. In der Darstellung als Balkendiagramm sind zum Vergleich die absoluten Werte der Zytokin-/Chemokinsekretion plus Negativkontrolle ohne Stimulans dargestellt (Abbildungen 20, 22, 24, 26 und 28).

Der Kolmogorov-Smirnov-Test zeigt, dass die Werte der Kontrollgruppe nicht normalverteilt sind. Da sie die größte Gruppe darstellt, wurden auch alle anderen Patientengruppen als nicht normalverteilt angesehen und daher für alle weiteren Berechnungen nicht parametrische Tests angewendet. Im Anschluss wurde der Levene-Test zur Überprüfung der Homogenität der Varianzen durchgeführt. Bei einem überwiegenden p-Wert von >0.1 zeigte der Levene-Test, dass die Varianzen der Daten innerhalb der einzelnen Patientengruppen homogen verteilt waren. Zur Überprüfung signifikanter Unterschiede wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Insgesamt fanden sich deutliche Unterschiede in der Zytokin-/Chemokinsekretion zwischen den Stimulantien FSL-1, PIC LPS, Flagellin und CL097. LPS war bei weitem der stärkste Stimulator für die IL-6-Sekretion. CL097 führte ebenfalls zu einer erhöhten Sekretion von IL-6 (Abbildung 20). Die Sekretion von CCL-18 war in der Gruppe der Typ 2 Diabetiker im Vergleich zu anderen Patientengruppen und den Kontrollen nach Stimulation mit FSL-1, PIC, LPS und Flagellin gesteigert (Abbildung 28). In der Mehrzahl der untersuchten Zytokine waren zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen. Lediglich die TNF- α -Sekretion zeigte nach Stimulierung mit FSL-1 (Tag 1) und Stimulierung mit CL097 (Tag 4) einen signifikanten Gruppenunterschied mit $H(3) = 8.57$ ($p < 0.05$, für T1DM versus T2DM, T1DM versus GDM, KONT versus GDM, KONT versus T2DM), bzw. mit $H(3) = 9.64$ ($p < 0.05$ T2DM versus GDM, KONT versus GDM). Die genaue Auflistung der Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests für sämtliche ELISA-Daten ist im Anhang A dargestellt.

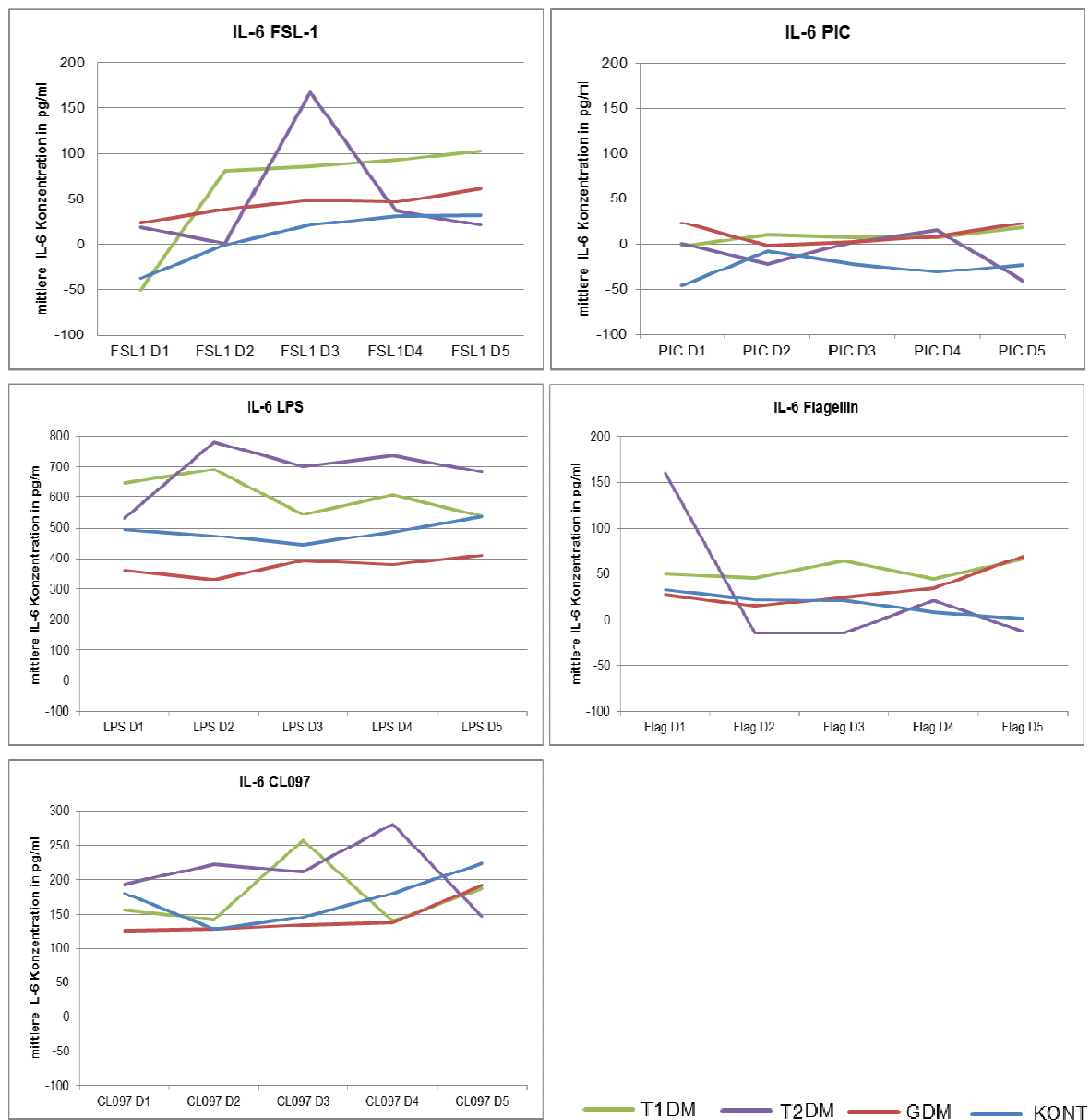


Abbildung 19: Zeitverlauf der Sekretion von IL-6 im Vollblutassay nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden

Dargestellt ist der Mittelwert der Gruppen abzüglich der basalen Sekretionsrate (Inkubation nur in RPMI). Stimulantien= FSL-1 (Konzentration: 1 µg/ml), PIC (Konzentration: 1 µg/ml), LPS (Konzentration: 10 ng/ml), Flagellin (Konzentration: 0,1 µg/ml), CL097 (Konzentration: 500 µg/ml). KONT= Kontrolle (n= 21), T1DM= Typ 1 Diabetiker (n= 6), T2DM= Typ 2 Diabetiker (n= 9), GDM= Gestationsdiabetikerinnen (n= 5).

Eine Steigerung der IL-6-Sekretion war nach Aktivierung von TLR4, und TLR7/TLR8 in allen Studiengruppen zu verzeichnen (Abbildung 19). Die IL-6-Spiegel nach Aktivierung von TLR2/TLR6 und TLR7/TLR8 waren in allen Gruppen im ähnlichen Bereich. Die höchste IL-6-Sekretion war nach Gabe von LPS bereits nach 24 Stunden zu beobachten (Abbildung 20). Nach Gabe von FSL-1-, Poly I:C und Flagellin war abzüglich der basalen Sekretionsrate (RPMI-Messung) keine Erhöhung der IL-6-Konzentration nachweisbar.

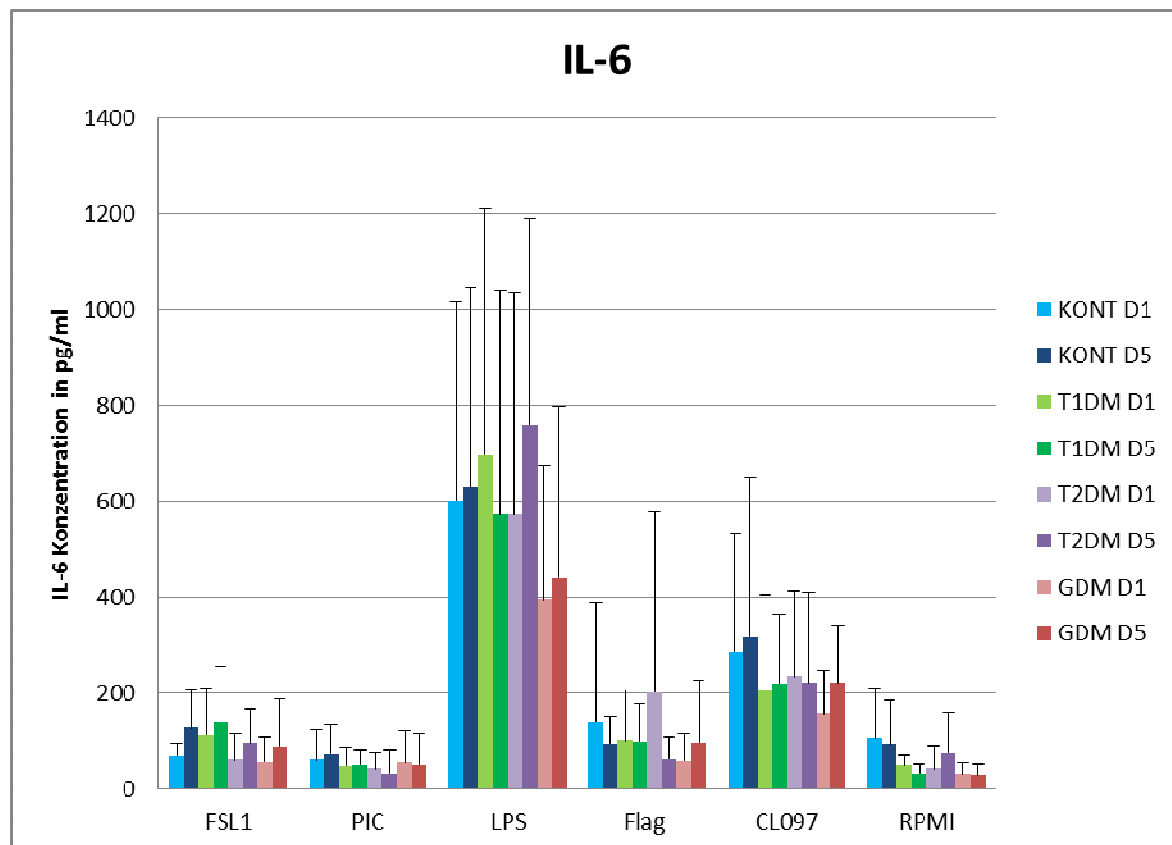


Abbildung 20: IL-6-Sekretion im Vollblutassay nach Stimulation mit verschiedenen TLR

Pro Stimulans sind je Tag 1 (D1) und Tag 5 (D5) des Vollblutassay (Mittelwert \pm SD). dargestellt. KONT= Kontrolle (n= 21), T1DM= Typ 1 Diabetiker (n= 6), T2DM= Typ 2 Diabetiker (n= 9), GDM= Gestationsdiabetikerinnen (n= 5).

Überraschenderweise trat im Vollblutassay in allen untersuchten Probandengruppen nach Aktivierung von TLR2/6, TLR3, TLR 4 und TLR 5 keine Steigerung der TNF- α -Sekretion im Vergleich zum Basalwert (nur Medium) auf. Die Gabe des TLR7/TRL8-Liganden CL097 führte zu einer TNF- α -Sekretion im Bereich 100-300 pg/ml.

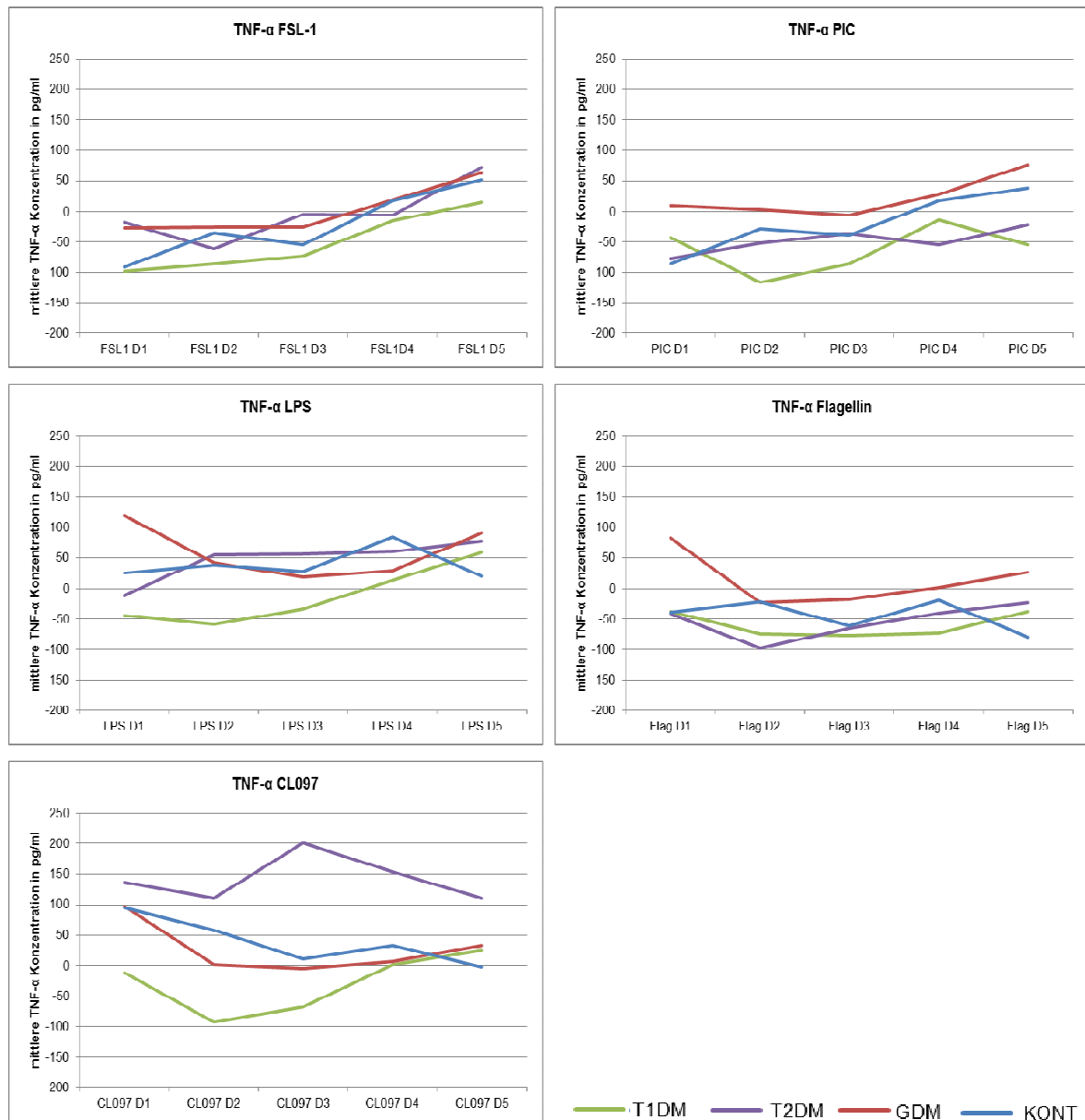


Abbildung 21: Zeitverlauf der Sekretion von TNF- α im Vollblutassay nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden

Dargestellt ist der Mittelwert der Gruppen abzüglich der basalen Sekretionsrate (Inkubation nur in RPMI). Stimulantien= FSL-1 (Konzentration: 1 μ g/ml), PIC (Konzentration: 1 μ g/ml), LPS (Konzentration: 10 ng/ml), Flagellin (Konzentration: 0,1 μ g/ml), CL097 (Konzentration: 500 μ g/ml). KONT= Kontrolle (n= 16-18), T1DM= Typ 1 Diabetiker (n= 4), T2DM= Typ 2 Diabetiker (n= 10), GDM= Gestationsdiabetikerinnen (n= 5).

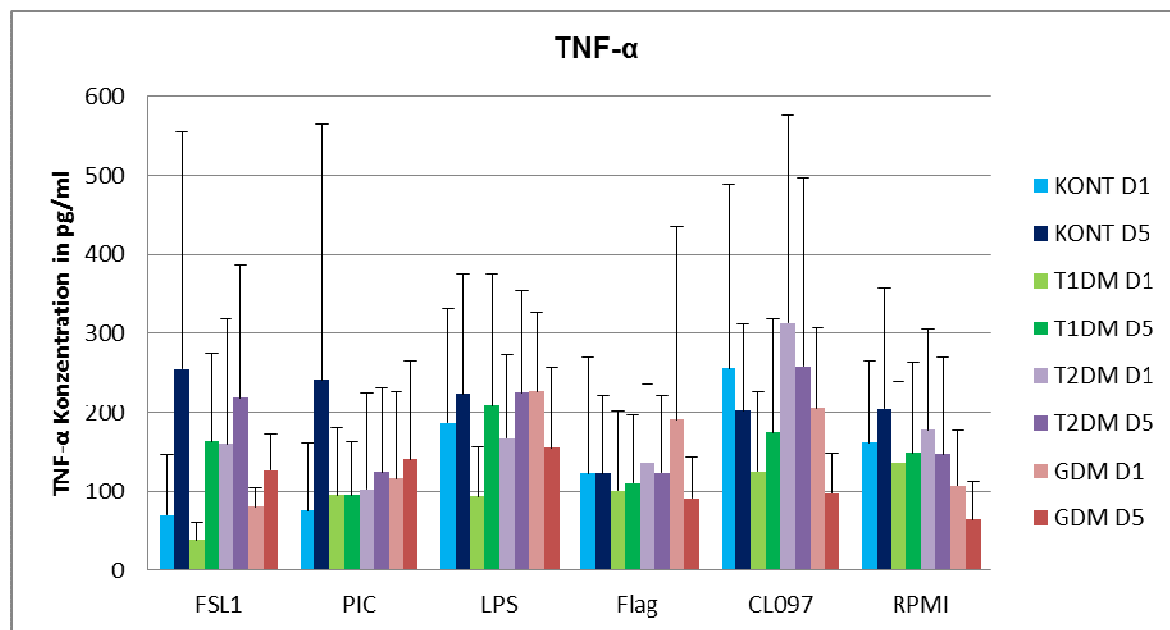


Abbildung 22: TNF- α -Sekretion im Vollblutassay nach Stimulation mit verschiedenen TLR

Pro Stimulans sind je Tag 1 (D1) und Tag 5 (D5) des Vollblut-Assay dargestellt (Mittelwert \pm SD). KONT= Kontrolle (n= 16-18), T1DM= Typ 1 Diabetiker (n= 4), T2DM= Typ 2 Diabetiker (n= 10), GDM= Gestationsdiabetikerinnen (n= 5).

Die IL12p70-Sekretion war bei allen Probanden nach Gabe der verschiedenen TLR-Liganden im Bereich der basalen Sekretion. Unter Stimulation mit LPS wurde in der Gruppe der Kontrollen und der Gestationsdiabetikerinnen an Tag 1 eine gering erhöhte IL-12p70-Sekretion im Vergleich zu den Typ 1 und den Typ 2 Diabetikern detektiert (Abbildung 24). Statistisch war dies jedoch nicht signifikant.

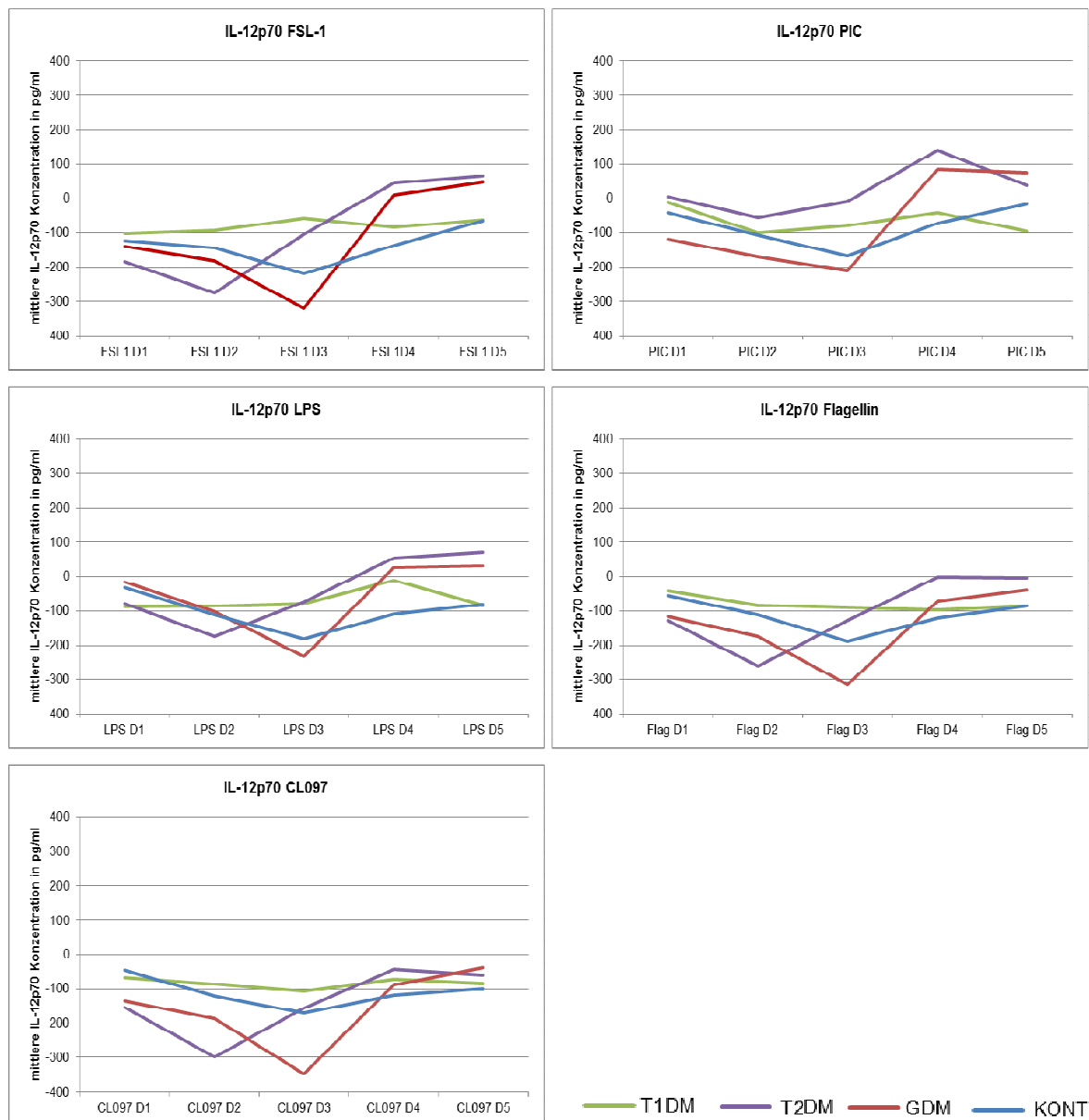


Abbildung 23: Zeitverlauf der Sekretion von IL-12p70 im Vollblutassay nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden

Dargestellt ist der Mittelwert der Gruppen abzüglich der basalen Sekretionsrate (Inkubation nur in RPMI). Stimulantien= FSL-1 (Konzentration: 1 µg/ml), PIC (Konzentration: 1 µg/ml), LPS (Konzentration: 10 ng/ml), Flagellin (Konzentration: 0,1 µg/ml), CL097 (Konzentration: 500 µg/ml). KONT= Kontrolle (n= 17-18), T1DM= Typ 1 Diabetiker (n= 5), T2DM= Typ 2 Diabetiker (n= 4-5), GDM= Gestationsdiabetikerinnen (n= 6).

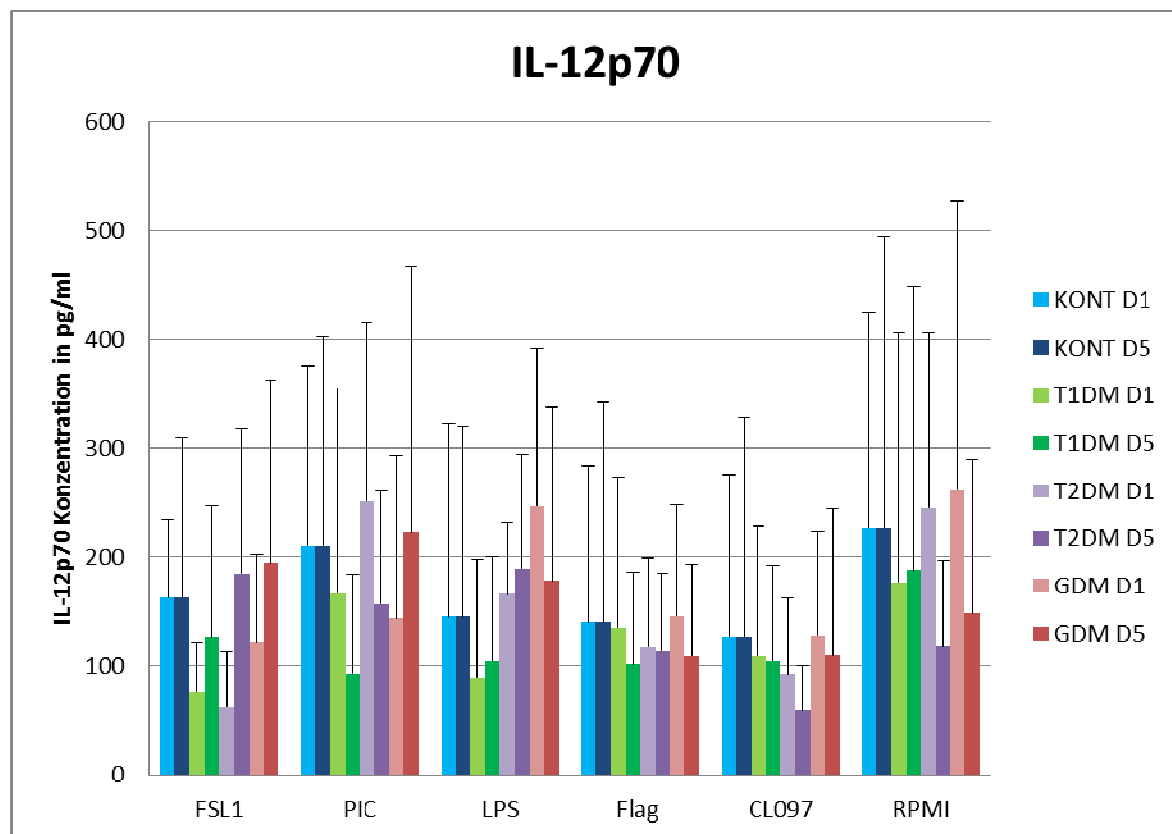


Abbildung 24: IL-12p70-Sekretion im Vollblutassay nach Stimulation mit verschiedenen TLR

Pro Stimulans sind je Tag 1 (D1) und Tag 5 (D5) des Vollblut-Assay dargestellt (Mittelwert \pm SD).

KONT= Kontrolle (n= 17-18), T1DM= Typ 1 Diabetiker (n= 5), T2DM= Typ 2 Diabetiker (n= 4-5), GDM= Gestationsdiabetikerinnen (n= 6).

Typ 2 Diabetiker zeigten im Vollblutassay die höchste basale Sekretion von IL-10 (RPMI-Medium). Aus logistischen Gründen wurde die IL-10-Produktion von Gestationsdiabetikerinnen nicht gemessen. Die Zugabe der TLR-Stimulantien führte zu keiner signifikanten Zunahme der IL-10-Sekretion. Die fehlende Steigerung der IL-10-Sekretion war ebenfalls bei Typ 1 Diabetikern und den Kontrollen zu sehen. Die statistische Analyse ergab keine signifikanten Gruppenunterschiede (Abbildung 25 und Abbildung 26).

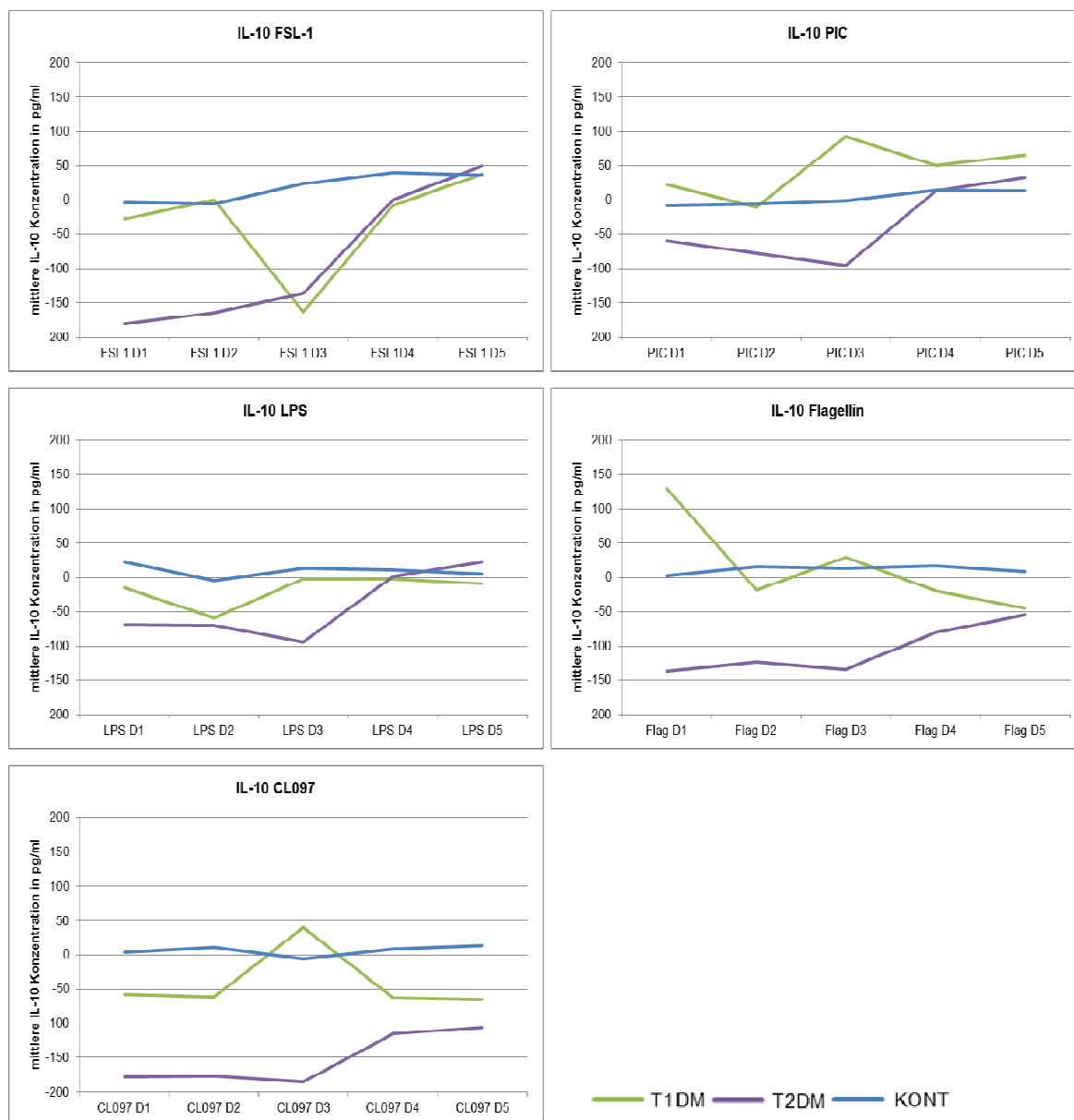


Abbildung 25: IL-10-Sekretion mononukleärer Zellen nach Stimulation mit verschiedenen Stimulantien nach Abzug der RPMI-Stimulationswerte als Negativkontrolle

Dargestellt ist der Mittelwert der Gruppen abzüglich der basalen Sekretionsrate (Inkubation nur in RPMI). Stimulantien= FSL-1 (Konzentration: 1 µg/ml), PIC (Konzentration: 1 µg/ml), LPS (Konzentration: 10 ng/ml), Flagellin (Konzentration: 0,1 µg/ml), CL097 (Konzentration: 500 µg/ml). KONT= Kontrolle (n= 2-3), T1DM= Typ 1 Diabetiker (n= 2-5), T2DM= Typ 2 Diabetiker (n= 3).

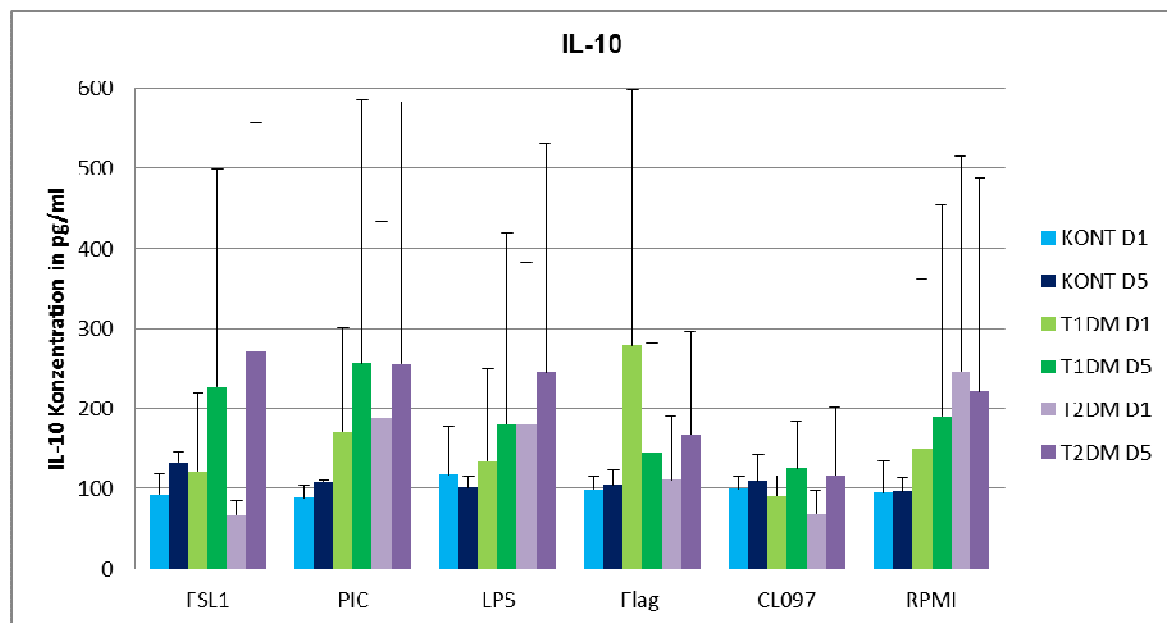


Abbildung 26: Mittlere IL-10-Konzentration im Zeit- und Gruppenvergleich

Pro Stimulans sind je Tag 1 (D1) und Tag 5 (D5) des Vollblut-Assay dargestellt (Mittelwert \pm SD). KONT= Kontrolle (n= 2-3), T1DM= Typ 1 Diabetiker (n= 2-5), T2DM= Typ 2 Diabetiker (n= 3).

Die Untersuchung der stimulusabhängigen CCL-18-Sekretion erbrachte bei Typ 1 Diabetikern, Typ 2 Diabetikern und bei den GDM-Patientinnen eine Sekretionsrate, die im Bereich der Negativkontrolle lag (RPMI-Medium) (Abbildung 28). Bei den Typ 2 Diabetikern war teils von Tag 3 an (FSL-1) und teils am Tag 5 (PIC, LPS, Flagellin, CL097) eine nicht-signifikante Steigerung der CCL-18-Sekretion nachweisbar (Abbildung 27).

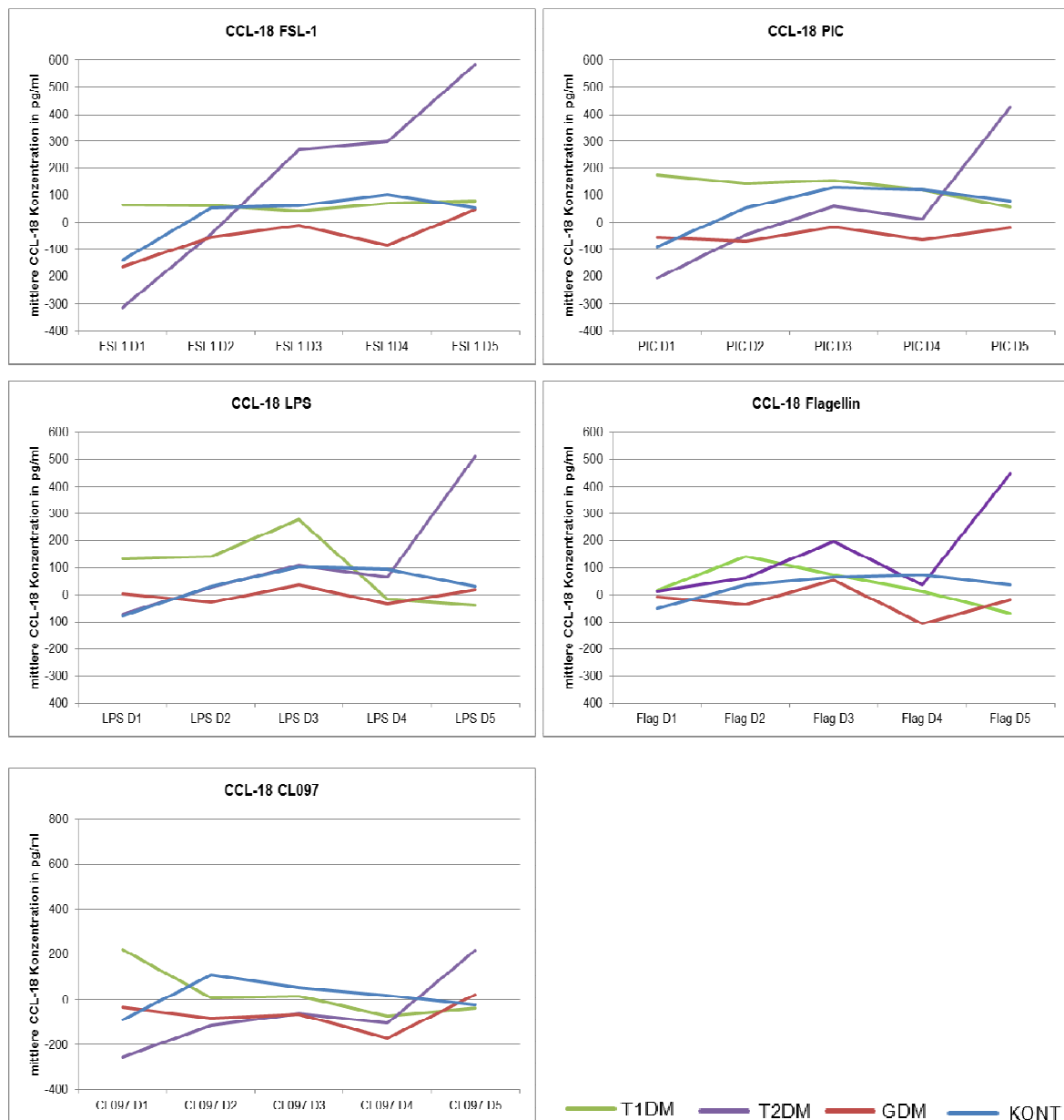


Abbildung 27: Zeitverlauf der Sekretion von CCL-18 im Vollblutassay nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden

Dargestellt ist der Mittelwert der Gruppen abzüglich der basalen Sekretionsrate (Inkubation nur in RPMI). Stimulantien= FSL-1 (Konzentration: 1 µg/ml), PIC (Konzentration: 1 µg/ml), LPS (Konzentration: 10 ng/ml), Flagellin (Konzentration: 0,1 µg/ml), CL097 (Konzentration: 500 µg/ml). KONT= Kontrolle (n= 20-21), T1DM= Typ 1 Diabetiker (n= 5-6), T2DM= Typ 2 Diabetiker (n= 9), GDM= Gestationsdiabetikerinnen (n= 7).

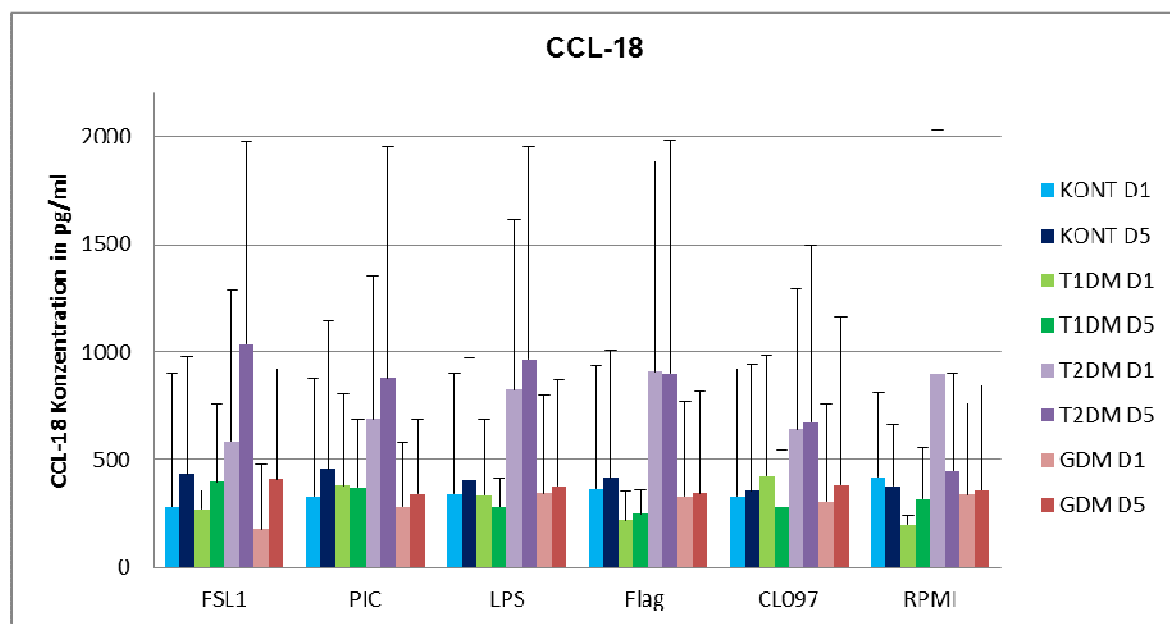


Abbildung 28: Mittlere CCL-18-Konzentration im Zeit- und Gruppenvergleich

Pro Stimulans sind je Tag 1 (D1) und Tag 5 (D5) des Vollblut-Assay dargestellt (Mittelwert \pm SD). KONT= Kontrolle (n= 20-21), T1DM= Typ 1 Diabetiker (n= 5-6), T2DM= Typ 2 Diabetiker (n= 9), GDM= Gestationsdiabetikerinnen (n= 7).

5 Diskussion

Das angeborene Immunsystem spielt eine bedeutende Rolle in der Pathogenese des Typ 1 und des Typ 2 Diabetes. Beim Typ 1 Diabetes sind Makrophagen und dendritische Zellen (DC) an der Präsentation von Autoantigenen und der Induktion sowie Regulation der Autoimmunantwort beteiligt. Beim Typ 2 Diabetes wird die subklinische Inflammation durch metabolitenabhängige Aktivierung verschiedener Zellen des angeborenen Immunsystems moduliert. Hier besteht eine enge Interaktion mit peripheren Organen (Fettgewebe, Leber, Muskel), die die Insulinresistenz entscheidend beeinflussen. Nach der Diabetesmanifestation besteht bei beiden Diabetestypen eine durch die Hyperglykämie bedingte Veränderung der Immunreaktion, welche unter anderem zu einer vermehrten Anfälligkeit gegenüber Infektionen beiträgt.

In der vorliegenden Studie sollten Daten über die Prävalenz von myeloiden und plasmazytoiden DC, über den Aktivierungsgrad der DC sowie die *in vitro* Immunantwort nach Aktivierung von Toll-like Rezeptoren (TLR) gewonnen werden. Ziel war es, mittels einer Pilotstudie Unterschiede zwischen gesunden Kontrollpersonen und Typ 1 Diabetikern sowie zwischen Typ 1 und Typ 2 Diabetikern zu charakterisieren.

5.1 Prävalenz der DC Subpopulationen im peripheren Blut

Nach der Identifizierung spezifischer Oberflächenmoleküle wurde es im Jahr 2007 möglich humane DC Subpopulationen im peripheren Blut zu quantifizieren (Blood Dendritic Cell Enumeration Kit). In vorangehenden Untersuchungen wurde bereits beschrieben, dass die Zahl von myeloiden und/oder plasmazytoiden DC bei einigen Autoimmunerkrankungen verändert ist. Gill und Mitarbeiter konnte eine verminderte Anzahl an plasmazytoiden dendritischen Zellen bei erhöhter IFN- α -Serumkonzentration bei Patienten mit systemischen Lupus erythematoses nachweisen (Gill 2002). In einer Studie im Jahr 2006 war bei Typ 1 Diabetikern eine normale Konzentration von myeloiden (CD11c-positiv) und plasmazytoiden DC (CD123-positiv) sowie eine normale DC Funktion beschrieben worden (Summers 2006). Mit neuen Nachweismethoden für die DC Subtypen wurden in der vorliegenden Arbeit keine Unterschiede in der absoluten und relativen Zahl der DC-Gesamtpopulation und in der Konzentration von myeloiden Typ 1 DCs und myeloiden Typ 2 DCs zwischen Typ 1 Diabetikern und Kontrollen sowie zwischen Typ 1

Diabetikern und Typ 2 Diabetikern detektiert. Die in der vorliegenden Studie bei den Kontrollpersonen gemessenen Konzentrationen der myeloiden DC1 und der myeloiden DC2 liegen etwas über dem beim DC Enumeration Kit angegebenen Referenzwerten für gesunde Personen (siehe 4.1). Allerdings stimmt der in dieser Arbeit detektierte prozentuale Anteil an myeloiden DC1, DC2 und plasmazytoiden DC in Relation zur Gesamtzahl der Leukozyten sehr gut mit den Angaben in der Literatur überein (Sato 2007). Beobachtet wurde ein Trend zu deutlich niedrigeren plasmazytoiden DC (BDCA-2/-4-positiv) bei Typ 1 und Typ 2 Diabetikern. Aufgrund der interindividuellen Schwankungen der DC Zahlen und der begrenzten Patientenzahlen war dieser Trend nicht signifikant. Die Schwankungen innerhalb der Gruppen können teilweise durch die niedrigen Prävalenz von DC in peripheren Blut (~ 1% der mononukleären Blutzellen) erklärt werden, so dass kleine messtechnische Abweichungen bereits einen deutlichen Einfluss auf das Ergebnis haben können.

Unsere Befunde werden durch neue Studienergebnisse unterstützt, die mit dem gleichen Assay bei Typ 1 Diabetikern (n= 72) eine signifikant erniedrigte Konzentration von plasmazytoiden DC bei normalen myeloiden DC mit oder ohne gleichzeitig reduzierten myeloiden Typ 1 DC (BDCA-1-positiv) nachgewiesen haben (Chen 2008; Hinkmann 2008). Die erniedrigte Zahl von plasmazytoiden DC wurde sowohl bei frisch manifestierten Typ 1 Diabetikern (n=23) wie auch bei Typ 1 Diabetikern mit seit langen bestehendem Typ 1 Diabetes (n=61) beobachtet (Vuckovic 2007). Eine andere Arbeitsgruppe beschrieb eine vermehrte Anzahl an plasmazytoiden DC Zellen bei frisch manifestierten Typ 1 Diabetikern (Median Tag 28, n= 40) im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen (Allen 2009). Die Gründe für diese teils diskrepanten Resultate sind bisher unklar. Bei anderen Autoimmunerkrankungen wurde im DC Enumeration Kit ebenfalls eine Reduktion zirkulierender plasmazytoider DC nachgewiesen. Bei 31 Patienten mit Sjögren-Syndrom war sowohl die Zahl von myeloiden Typ 1 DC wie auch die plasmazytoiden DC im peripheren Blut im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen signifikant erniedrigt (Vogelsang 2010). In einer Untersuchung von Jongbloed und Mitarbeitern wurde über eine verminderte Zahl von plasmazytoiden DC bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (n=12) und Psoriasis Arthritis (n=13) berichtet. Gleichzeitig war die Konzentration von myeloiden DC im peripheren Blut bei Patienten mit rheumatischer Arthritis reduziert (Jongbloed 2006).

Myeloide und plasmazytoide DC sind aus dem Knochenmark stammende antigenpräsentierende Zellen (APZ), die im Blut zirkulieren und auf spezifische Reize hin ins periphere Gewebe auswandern können. Plasmazytoide DC sind charakterisiert durch die Sekretion von Typ 1 Interferonen (INF- α und INF- β) als Antwort auf Virusinfektionen oder ssRNA

bzw. ssDNA. Reife myeloide DC können eine starke proinflammatorische Immunreaktion (Polarisation von naiven T-Zellen zu Th1-Lymphozyten und zytotoxischen T-Zellen) induzieren, wohingegen den unreifen myeloiden DC immuninhibierende Wirkungen zugesprochen werden. Trotz der antiviralen Reaktivität zeigen plasmazytoide DC auch immunsupprimierende Eigenschaften mit Induktion von CD4⁺ und CD8⁺ regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) (Matta 2010). Der Nachweis von reduzierten zirkulierenden DC im peripheren Blut bei Autoimmunerkrankungen könnte darauf hinweisen, dass vermehrt plasmazytoide DC aus dem Blut in Lymphknoten oder entzündliches Gewebe (z.B. in die Langerhans-Inseln bei Typ 1 Diabetes oder das Fettgewebe bei Typ 2 Diabetes) auswandern. Bei rheumatoider Arthritis wurde eine niedrige Zahl von DC im peripheren Blut aber eine hohe Konzentration von myeloiden und plasmazytoiden DC in der entzündeten Synovia beobachtet (Jongbloed 2006). Beim Typ 1 Diabetes wird eine Fehlregulation der plasmazytoiden DC mit nachfolgender Verminderung von antiinflammatorischen T-Zellen und/oder T_{reg}-Zellen diskutiert. Im Modell der NOD-Maus besteht eine Dysbalance zwischen den antidiabetogenen, plasmazytoiden DC und den proinflammatorischen, aktivierten myeloiden DC, welche die Autoimmunreaktion und β -Zelldestruktion triggern (Saxena 2007). Insofern könnten unsere Ergebnisse bei Typ 1 Diabetikern darauf hinweisen, dass die verminderte Zahl von plasmazytoiden DC eine Störung des Gleichgewichts zwischen tolerogenen und proinflammatorisch wirkenden Immunzellen widerspiegelt.

Eine alternative Erklärung für die reduzierte Zahl an plasmazytoiden DC ist eine Störung der Zellausreifung im Knochenmark. Die Ausreifung von plasmazytoiden DC wird durch das Zytokin TNF- α gehemmt. Sowohl beim Typ 1 Diabetes wie auch beim Typ 2 Diabetes wurde eine Erhöhung der Plasma-TNF- α -Konzentration beschrieben (Spranger 2003; Pham 2011). Diese Erklärung würde gut mit unserem Befund einer reduzierten Zahl von plasmazytoiden DC bei Patienten mit Typ 2 Diabetes übereinstimmen. Die Reduktion von plasmazytoiden DC bei Typ 2 Diabetes wurde mittlerweile auch von einer anderen Studie bestätigt (Seifarth 2008). Nicht auszuschließen ist auch ein negativer Effekt einer chronischen Hyperglykämie auf die Ausreifung von plasmazytoiden DC und/oder die Regulation der Zellzahl im peripheren Blut. Für diese Erklärung können auch die niedrigen DC-Zahlen bei Patientinnen mit GDM sprechen. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die Regulation der DC Subtypen und der DC Werte im peripheren Blut auch von hormonellen Faktoren abhängig ist, so dass die Werte, die in der Schwangerschaft gewonnen wurden mit Vorsicht interpretiert werden müssen (Munoz-Suano 2011). Ob die Zahl und ggf. auch die Funktion der plasmazytoiden DC bei Typ 1 und Typ 2 Diabetikern tatsäch-

lich signifikant reduziert sind und welche Mechanismen diesen Effekt erklären können, muss in weiterführenden Untersuchungen mit einer deutlich größeren Zahl von Patienten geklärt werden.

Neben der absoluten und relativen Zahl zirkulierender myeloider und plasmazytoider DC wurde in der vorliegenden Studie auch untersucht, inwieweit Unterschiede in den DC nachweisbar sind, die sich aus dem peripheren Blut aus Monozyten generieren lassen, und ob die DC Unterschiede in der Expression von Oberflächenmolekülen aufweisen. Es wurden deshalb in mehreren Versuchsreihen in der Literatur beschriebene etablierte Methoden zur *in vitro* Gewinnung von DC aus peripheren Monozyten ausgetestet (Romani 1994; Tarte 2000; Gill 2002; Dauer 2003a; Haase 2005). Letztlich wurde das Protokoll von Dauer und Mitarbeitern eingesetzt, da hiermit eine gute Reinheit der Zellen und gute Zellvitalität erzielt werden konnte. Am Tag 5 erfolgte eine Aktivierung der DC mit TNF- α , das zu einer Ausreifung der DC und Hochregulation von kostimulierenden Molekülen (CD80, CD86) und HLA-Klasse-II-Molekülen (HLA-DR) führt. In der FACS-Analyse zeigte sich anhand der Oberflächenantigene eine Population von myeloiden dendritischen Zellen, die die DC Marker CD11c, BDCA-4 und in geringerem Umfang auch BDCA-1 exprimieren. Zu beachten ist, dass bei primär aus dem Blut isolierten DC das Oberflächenmolekül BDCA-1 myeloide DC charakterisiert und BDCA-4 hochspezifisch ist für die plasmazytoide DC Population (Kassianos 2012). Nach der Kultivierung von DC oder der Isolierung von DC aus Monozyten zeigt sich ein anderes Bild. In diesem Falle ändern die myeloiden DC ihr Expressionsmuster und die CD11c-positiven DC werden ebenfalls positiv für den Marker BDCA-4 (Dzionek 2000). Somit entspricht das in der vorliegenden Studie beschriebene Expressionsmuster der DC dem nach der *in vitro* Kultivierung typischen Bild von myeloiden aus Monozyten ausgereiften DC (Dzionek 2000; Dauer 2003b; Sato 2007; Kvistborg 2009; Kassianos 2012). Da das Expressionsmuster in allen Studiengruppen ähnlich war, hat sich die Erwartung einer gesteigerten Zahl von aus Monozyten ausreifenenden, proinflammatorischen myeloiden DC bei Typ 1 Diabetikern nicht bestätigt. Auch der Aktivierungsgrad der DC, gemessen am prozentualen Anteil und an der „Mean-Fluorescence-Intensity“ von CD80, CD86, CD209 und HLA-DR, ergab keinen Trend und keine signifikante Differenz. Diese Resultate zeigen, dass zwischen den Diabetikern und den gesunden Kontrollen keine fassbaren Unterschiede bezüglich der Generierung von funktionell aktiven DC aus Blutmonozyten bestehen.

5.2 *Ex vivo* Untersuchung der Aktivität des angeborenen Immunsystems

Antigenpräsentierende Zellen (APZ) exprimieren auf der Zelloberfläche und intrazytoplasmatisch TLR (beim Menschen sind bisher 10 TLR bekannt), die sehr spezifisch Muster von Pathogenen erkennen. Die Bindung von TLR-Liganden führt auf der Ebene der APZ zu einer Hochregulierung von kostimulierenden Molekülen sowie zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, die eine starke Aktivierung des adaptiven Immunsystems bewirken (Dzopalic 2012). TLR sind unter anderem in hohen Konzentrationen in mononukleären Blutzellen nachweisbar. Für die Messung der Reaktivität des angeborenen Immunsystems wurde ein Vollblutassay im Labor etabliert. Nach der Aktivierung von Toll-like Rezeptoren (TLR) durch ausgewählte Stimuli (Tabelle 5) erfolgte die Messung verschiedener Zytokine und Chemokine, von denen angenommen wird, dass sie in der Regulation der Immunantwort bei Typ 1 Diabetes beteiligt sind und von im Blut zirkulierenden Monozyten und/oder dendritischen Zellen sezerniert werden können. Da das Probenvolumen begrenzt war, erfolgte eine Auswahl von Zytokinen, die proinflammatorisch wirken (IL-6, IL-12p70, TNF- α) und von Zytokinen/Chemokinen, die antiinflammatorische Effekte zeigen (IL-10, CCL-18). Vollblutassays haben den Vorteil der Messung der Zytokinsekretion verschiedener Blutzellen ohne vorangehender Manipulation der Probe durch eine Zellseparierung. In vorangehenden Arbeiten wurde über eine gute Reproduzierbarkeit von Vollblutassays berichtet (van der Linden 1998; Damsgaard 2009). Aufgrund der gemischten Blutzellpopulation, der unklaren Dynamik verschiedener Zytokine/Chemokine und möglicher Unterschiede zwischen den Studiengruppen wurden die Analysen über 5 Tage durchgeführt. Zu erwarten war eine gesteigerte Zytokin-/Chemokinproduktion bereits innerhalb der ersten 24 Stunden.

Bei der Interpretation der Vollblutassay-Daten ist generell zu berücksichtigen, dass die hier analysierten Zytokine unter anderem von Monozyten, dendritischen Zellen, T- und B-Zellen, NK-Zellen und Granulozyten produziert werden können. In vorangehenden Studien mit einem direkten Vergleich der Zytokinsekretion im Vollblut und in isolierten Monozyten wurde darüber berichtet, dass nach Stimulation mit LPS (TLR-4) oder *Lactobacillus acidophilus* X37 (TLR-2) der bei weitem größte Teil von IL-6 und TNF- α von den Blutmonozyten sezerniert wird, die etwa 10% der peripheren Leukozyten ausmachen (Damsgaard 2009). Durch den Kontakt mit dem Plastikmaterial ist sicherlich bereits eine Steigerung der Grundaktivierung der Zellen im Vergleich zur *in vivo* Situation gegeben. Dies erklärt teilweise die von uns beobachtete basale Zytokin-/Chemokinsekretion der Proben ohne Zusatz von TLR-Liganden.

Der Vergleich der Zytokinsekretionsmuster zwischen den verschiedenen Gruppen erbrachte in einigen Versuchsansätzen nur geringe Unterschiede. Insgesamt betrachtet waren keine signifikanten Unterschiede nach Stimulierung von TLR3, TLR4 und TLR5 zwischen den verschiedenen Probandengruppen zu beobachten.

Signifikant niedrigere TNF- α -Konzentrationen waren in der Typ 1 Diabetikergruppe nach Stimulation mit FSL-1 am Tag 1 im Vergleich zu den anderen Gruppen nachweisbar. Signifikant höhere TNF- α -Spiegel waren bei Typ 2 Diabetikern nach Stimulation mit CL097 am Tag 4 im Vergleich zu den GDM-Patientinnen und den Kontrollpersonen zu beobachten. Nach Aktivierung von TLR3, TLR4 und TLR5 lagen die TNF- α -Spiegel im Bereich des Basalwertes. Dieser überraschende Befund steht im Widerspruch zu anderen Studien, die nach Flagellin- oder LPS-Gabe eine Aktivierung der TLR auf PBMC von gesunden Kontrollpersonen gezeigt haben, welche mit einer 5-20-fachen Steigerung der TNF- α -Konzentration im Überstand von Vollblutassays assoziiert war (McKernan 2011; Dennison 2012). Die Gabe des TLR7/TLR8 Liganden CL097 führte nach 24 Stunden zu einer TNF- α -Konzentration von 100-300 pg/ml, die im Bereich anderer Studien liegt.

Der Vergleich der vorliegenden Resultate für TNF- α , aber auch für alle anderen gemessenen Zytokine/Chemokine, mit vorangehenden Studien ist aus mehreren Gründen schwierig. In vielen Untersuchungen wurde der Vollblutassay eingesetzt mit einer Verdünnung der Proben von 1:5 bis 1:10, ohne dass er auf die Gesamtzellzahl der Leukozyten normiert wurde (McKernan 2011; Dennison 2012). Differenzen in der Zytokin-/Chemokinsekretion können damit auch nur durch Unterschiede in der absoluten Zellzahl der Monozyten/DC/Leukozyten erklärt werden. Zusätzlich wurden in verschiedenen Studien unterschiedliche Konzentrationen der TLR Liganden verwendet. Um eine Überstimulation der Zellen zu vermeiden und ggf. bis zu 5 Tage messen zu können, wurde in der vorliegenden Studie nur 10 ng/ml LPS eingesetzt. Diese LPS-Konzentration kann die Sekretion von TNF- α und IL-6 aus PMBC steigern (Kikkert 2008), liegt aber deutlich niedriger im Vergleich zu den meisten anderen Studien, die 1 μ g/ml LPS eingesetzt haben (Dennison 2012, McKernan 2011).

Eine deutliche Steigerung der IL-6 Sekretion war in unserer Studie nach Aktivierung von TLR4 und TLR7/TLR8 zu verzeichnen. Die Sekretion von IL-6 lag bei den Typ 1 Diabetikern zu allen Untersuchungszeitpunkten nicht-signifikant höher als in den anderen Gruppen. Die höchste IL-6-Sekretion war nach Gabe von LPS bereits nach 24 Stunden zu beobachten. Der Trend zu erhöhten IL-6-Werten nach Aktivierung von TLR4 und TLR7/TLR8 stimmt gut überein mit Studien, die erhöhte IL-6-Plasmaspiegel bei Patienten

mit Typ 1 Diabetes oder Typ 2 Diabetes im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen beschrieben haben (Pham 2011).

Die Messung von IL-12p70, eines weiteren proinflammatorischen Zytokins, erbrachte überraschenderweise keine signifikante Steigerung der basalen Sekretion und keine Gruppenunterschiede. IL12p70 wird im Vollblut von DCs produziert und ist beim Typ 1 Diabetes mit der Entwicklung des autoimmunen Diabetes assoziiert. Nach den vorliegenden Daten muss vermutet werden, dass die Stimuli entweder nur zu einer sehr kurzfristigen IL-12-Sekretion führen, die bereits nach 24 Stunden nicht mehr nachweisbar ist, oder der Vollblutassay, wie er in der vorliegenden Studie verwendet worden ist, kein geeignetes System darstellt, um die Regulation von IL-12p70 zu analysieren.

Neben den proinflammatorischen Zytokinen wurde in der vorliegenden Studie auch IL-10, ein wichtiges Zytokin mit starker antiinflammatorischer Aktivität untersucht. Es kann unter anderem von Monozyten und plasmazytoiden DC produziert werden. IL-10 war in allen Gruppen durch TLR Liganden in der von uns gewählten Konzentration nicht über den Basalbereich stimulierbar. Untersuchungen der IL-10-Plasmazytokinkonzentration haben keine Unterschiede zwischen Patienten mit Typ 1 Diabetes, latentem autoimmunen Diabetes im Erwachsenenalter (LADA) und gesunden Kontrollen für die IL-10-Spiegel ergeben. Allerdings wurden signifikant höhere IL-10-Konzentrationen bei Patienten mit Typ 2 Diabetes beschrieben (Pham 2011). Dies konnte in der vorliegenden Studie im Vollblutassay nicht bestätigt werden.

CCL-18 ist ein bisher wenig untersuchtes Chemokin, welches in hoher Konzentration in der Lunge und in Lymphknoten produziert und von antigenpräsentierenden Zellen (Monozyten, DC, Makrophagen) sezerniert wird. Die Funktion von CCL-18 wird bisher noch nicht vollständig verstanden. CCL-18 ist ein chemotaktischer Faktor für naive CD4-positive Lymphozyten, Memory-T-Zellen und immature DC. Es induziert die Entwicklung von T-Helfer-2-Zellen, tolerogenen DC und besitzt Einfluss auf die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen (Schutyser 2005; Azzaoui 2011). Aus in vitro Untersuchungen ist bekannt, dass Monozyten/Makrophagen und DC im peripheren Blut spontan CCL-18 produzieren. Nach Aktivierung durch LPS, Peptidoglycanen oder CD40-L wird vermehrt CCL-18 sezerniert. Diese Aktivierung kann bei Anwesenheit von klassischen T-Helfer-2-Zytokinen (IL-4, IL-10, IL-13) oder konditioniertem T-Zell-Medium nochmals deutlich erhöht werden, während T-Helfer-1-Zytokine wie z.B. IFN- γ die CCL-18 Sekretion hochsignifikant hemmen können (Schutyser 2005). Erhöhte Plasmaspiegel von CCL-18 wurden bei Lungen- und Hauterkrankungen beschrieben (Schutyser 2005; Rosenberg 2012). Im

Plasma von Patienten mit Sklerodermie wurden erhöhte CCL-18 Werte im Vergleich zu Patienten mit rheumatoider Arthritis und gesunden Kontrollen detektiert (van Lieshout 2009). Bei rheumatoider Arthritis war vermehrt CCL-18 in der Synovia, nicht aber im Plasma nachweisbar (Schutyser 2005). Interpretiert wurde die erhöhten CCL-18-Spiegel bei Autoimmunerkrankungen durch einen Versuch des Immunsystems die Immunaktivierung einzugrenzen.

In der vorliegenden Studie wurde erstmals die Konzentration von CCL-18 im Vollblutassay mit Aktivierung durch TLR-Liganden untersucht. Es fand sich ein Trend zu höherer CCL-18-Sekretion nach Stimulation mit FSL-1, PIC, LPS und CL097 bei den Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen und den Typ 1 Diabetikern am Tag 5, der jedoch aufgrund der großen Streubreite der Werte nicht signifikant war. In weiterführenden Studien wäre es interessant zu untersuchen, welche Zellen für die relativ hohe basale (~ 350 pg/ml) und stimulierte CCL-18 Sekretion (~ 900 pg/ml) verantwortlich sind.

5.3 Limitationen des Studiendesigns

Die vorliegende Studie wurde primär als Pilotstudie konzipiert, die erste Aussagen über Unterschiede der DC-Typen, des Aktivierungsgrades der DC und der TLR-stimulusabhängigen Zytokinsekretion zwischen Typ 1 Diabetikern und gesunden Kontrollpersonen ermöglichen sollte. Eine Gruppe von Typ 2 Diabetikern und von Patientinnen mit Gestationsdiabetes wurden als weitere Kontrollgruppen mit aufgenommen, da hier zwar eine Diabetes mellitus aber keine Autoimmunphänomene vorliegen. Innerhalb des Studienzeitraums konnte nur eine begrenzte Zahl von Patienten rekrutiert werden, die 1) die Einschlusskriterien erfüllt haben und die 2) die Zustimmung für die Abnahme einer größeren Menge Blut gaben. Da es notwendig war immer mit frischem Blut zu arbeiten, konnte nicht auf asservierte Proben zurückgegriffen werden. Die begrenzte Blutmenge führte dazu, dass nicht bei allen Probanden alle FACS Analysen und die *in vitro* Stimulationstests durchgeführt werden konnten. Die kleinen Gruppengrößen der Patienten und Kontrollpersonen sind sicherlich eine wichtige Erklärung dafür, dass in der vorliegenden Studie meist nur Trends, aber keine signifikanten Unterschiede zu beobachten waren. Bei der Interpretation der Ergebnisse muss zusätzlich beachtet werden, dass die Kontrollpersonen nach Altersstruktur und Geschlecht ähnlich zu den Typ 1 Diabetikern ausgewählt wurden. Da die DC-Konzentration im peripheren Blut mit dem Alter abnimmt, könnten die niedrigen Zahlen der plasmazytoiden DC bei den Typ 2 Diabetikern zumindest teilweise auch auf das Alter zurückgeführt werden (Chen 2008). Trotz der genannten Einschränkungen

kungen durch das Studiendesign und den Studienablauf liefert die vorliegende Arbeit einige wichtige Hinweise auf eine Störung der Balance zwischen den verschiedenen DC Populationen bei Patienten mit Diabetes mellitus, die weiterführende Analysen rechtfertigt.

5.4 Ausblick

Die experimentellen Untersuchungen der vorliegenden Studie wurden in den Jahren 2007 und 2008 durchgeführt. Auch nach der neuesten Literatur bleibt unklar, ob eine primäre Dysregulation von verschiedenen DC Subpopulationen beim Typ 1 Diabetes im Vergleich zum Typ 2 Diabetes und/oder gesunden Kontrollpersonen vorliegt. Es besteht Konsens in der Auffassung, dass die DC einen zentralen Regulator für die Induktion und den Verlauf der Autoimmunreaktion beim Typ 1 Diabetes darstellen. Die Bestimmung der Bedeutung der DC für die Entwicklung eines Typ 1 Diabetes wird dadurch erschwert, dass beim Menschen immer nur Analysen von gut zugänglichen Zellen/Geweben, wie z.B. Blutzellen, möglich sind. Diese müssen aber nicht unbedingt das Muster der lokalen Autoimmunreaktion in der Langerhans'schen Inseln oder den Lymphknoten widerspiegeln. Aus unseren Analysen kann abgeleitet werden, dass es ggf. sinnvoll wäre die plasmazytoiden und myeloiden DC aus dem Blut primär zu separieren (z.B. über Magnetic Beads wie von Allen und Mitarbeitern beschrieben (Allen 2009)) und anschließend sofort einer FACS Analyse zum Nachweis von Oberflächenmarkern sowie zur Detektion der intrazytoplasmatischen Zytokin-/Chemokinprofile zu unterziehen. Eine weitere Optimierung des Vollblutassays mit engmaschigerem Nachweis der Zytokinsekretion in den ersten 24 Stunden könnte ebenfalls wichtige neue Informationen über diabetesspezifische Muster hinsichtlich der Dynamik der Produktion von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen erbringen.

Plasmozytoide DC sezernieren große Mengen an IFN- α . Da nach der Befundauswertung der FACS-Analysen im peripheren Blut eine Reduktion der plasmazytoiden DC zu verzeichnen war, wäre es sehr interessant gewesen bei den gleichen Personen zu messen, ob nach der Stimulation durch TLR Liganden Unterschiede in der IFN- α -Sekretion bei Typ 1 und Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu den gesunden Kontrollen nachweisbar sind. Aufgrund des Studiendesigns war nach der Analyse der beschriebenen Zytokine/Chemokine leider nicht mehr ausreichend Probenmaterial verfügbar. Diese wichtige Fragestellung sollte in nachfolgenden Studien beantwortet werden.

6 Zusammenfassung

Antigenpräsentierende Zellen (dendritische Zellen, Makrophagen) spielen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des Typ 1 und des Typ 2 Diabetes. Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob im peripheren Blut von Typ 1 Diabetikern (T1DM) Unterschiede in den Subpopulationen von dendritischen Zellen (DC), in Zellaktivierungsmarkern oder in der Reaktivität von Zellen des angeborenen Immunsystems im Vergleich zu Typ 2 Diabetikern (T2DM), Gestationsdiabetikerinnen (GDM) und gesunden Kontrollpersonen bestehen.

Eingesetzt wurde der DC Enumeration Kit zur Quantifizierung der Zahl von Typ 1 myeloiden DCs, Typ 2 myeloiden DCs und von plasmazytoiden DCs. Mit Durchflusszytometrie wurden zusätzlich spezifische Oberflächenmoleküle nach *in vitro* Generierung von DCs aus peripheren Blutmonozyten untersucht. Mittels eines Vollblutassays erfolgte die Bestimmung der Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen (IL-6, TNF- α , IL-12p70), des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 und des Chemokins CCL-18 nach Stimulierung mit spezifischen Toll-like-Rezeptor Liganden (FSL-1: TLR2/6, PIC: TLR3, LPS: TLR4, Flagellin: TLR5, CL097: TLR7/8).

In der Studie konnte eine nicht-signifikante verminderte Konzentration von plasmazytoiden DCs (BDCA-2/-4-Marker-positiv) bei Typ 1 und Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu den Kontrollpersonen nachgewiesen werden. Die Zahl der aus peripheren Blutmonozyten generierten DCs und die Expressionsstärke von charakteristischen DC-Markern und Aktivierungsoberflächenmolekülen waren innerhalb der Gruppen nicht unterschiedlich. Im Vollblutassay konnten keine eindeutigen Unterschiede zwischen T1DM, T2DM und gesunden Kontrollen nachgewiesen werden. Allein die TNF- α -Sekretion war bei T1DM signifikant erniedrigt nach 2-tägiger Stimulation mit FSL-1 (TLR2/6 Ligand) und bei T2DM erhöht nach 4-tägiger Stimulierung mit CL097 (TLR7/8) ($p < 0.05$).

In der Zusammenschau der Ergebnisse fanden sich in der vorliegenden Pilotstudie Hinweise auf eine reduzierte Zahl von plasmazytoiden DCs im peripheren Blut von Patienten mit Typ 1 und Typ 2 Diabetes. Dies könnte auf eine Störung der Balance zwischen plasmazytoiden und myeloiden DCs bei Diabetikern hinweisen. Diese Hypothese sollte in einem größeren Patientenkollektiv unter Einschluss von spezifischen Analysemethoden zur Quantifizierung der funktionellen Aktivität der verschiedenen DC-Subpopulationen geklärt werden.

7 Literaturverzeichnis

- Abdul-Ghani M. A. et al. (2010). "Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle." J Biomed Biotechnol 2010: 476279.
- Ahmed R. et al. (1996). "Immunological memory and protective immunity: understanding their relation." Science 272(5258): 54-60.
- Åkerblom H. K. et al. (2002). "Environmental factors in the etiology of type 1 diabetes." American Journal of Medical Genetics 115(1): 18-29.
- Akerblom H. K. et al. (2005). "Dietary manipulation of beta cell autoimmunity in infants at increased risk of type 1 diabetes: a pilot study." Diabetologia 48(5): 829-837.
- Alberti K. G. et al. (2009). "Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity." Circulation 120(16): 1640-1645.
- Allen J. S. et al. (2009). "Plasmacytoid dendritic cells are proportionally expanded at diagnosis of type 1 diabetes and enhance islet autoantigen presentation to T-cells through immune complex capture." Diabetes 58(1): 138-145.
- Asano M. et al. (1996). "Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation." J Exp Med 184(2): 387-396.
- Association American Diabetes (2008). "Economic Costs of Diabetes in the U.S. in 2007." Diabetes Care 31(3): 596-615.
- Association American Diabetes (2010). "Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus." Diabetes Care 33(Supplement 1): S62-S69.
- Azzaoui I. et al. (2011). "CCL18 differentiates dendritic cells in tolerogenic cells able to prime regulatory T cells in healthy subjects." Blood 118(13): 3549-3558.
- Bassing Craig H. et al. (2002). "The Mechanism and Regulation of Chromosomal V(D)J Recombination." Cell 109(2, Supplement 1): S45-S55.
- Bonilla F. A. et al. (2010). "Adaptive immunity." J Allergy Clin Immunol 125(2 Suppl 2): S33-40.
- Breitling Lutz Philipp (2006). Subpopulationen dendritischer Zellen im Nabelschnurblut afrikanischer Neugeborener und ihre Veränderungen im Zusammenhang mit maternaler Plasmodium falciparum-Belastung. Institut für Tropenmedizin, Sektion Humanparasitologie; Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen. Tübingen, Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen. Doktorgrad der Medizin: 77.
- Butler A. E. et al. (2003). "Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes." Diabetes 52(1): 102-110.
- Capeau J. (2008). "Insulin resistance and steatosis in humans." Diabetes Metab 34(6 Pt 2): 649-657.

- Chen X. et al. (2008). "Type 1 diabetes patients have significantly lower frequency of plasmacytoid dendritic cells in the peripheral blood." Clin Immunol 129(3): 413-418.
- Commings S. P. et al. (2010). "Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines." J Allergy Clin Immunol 125(2 Suppl 2): S53-72.
- Concannon P. et al. (2009). "Genetics of type 1A diabetes." N Engl J Med 360(16): 1646-1654.
- Cornier Marc-Andre et al. (2008). "The Metabolic Syndrome." Endocr Rev 29(7): 777-822.
- Cyster J. G. (1999). "Chemokines and the homing of dendritic cells to the T cell areas of lymphoid organs." J Exp Med 189(3): 447-450.
- Dahlen Eva et al. (1998). "Dendritic Cells and Macrophages Are the First and Major Producers of TNF- α in Pancreatic Islets in the Nonobese Diabetic Mouse." J Immunol 160(7): 3585-3593.
- Damsgaard C. T. et al. (2009). "Whole-blood culture is a valid low-cost method to measure monocytic cytokines - a comparison of cytokine production in cultures of human whole-blood, mononuclear cells and monocytes." J Immunol Methods 340(2): 95-101.
- Danilova N. (2006). "The evolution of immune mechanisms." J Exp Zool B Mol Dev Evol 306(6): 496-520.
- Dauer M. et al. (2003a). "Interferon-alpha disables dendritic cell precursors: dendritic cells derived from interferon-alpha-treated monocytes are defective in maturation and T-cell stimulation." Immunology 110(1): 38-47.
- Dauer Marc et al. (2003b). "Mature Dendritic Cells Derived from Human Monocytes Within 48 Hours: A Novel Strategy for Dendritic Cell Differentiation from Blood Precursors." J Immunol 170(8): 4069-4076.
- De Winter B. Y. et al. (2010). "Interplay between inflammation, immune system and neuronal pathways: effect on gastrointestinal motility." World J Gastroenterol 16(44): 5523-5535.
- DeFronzo R. A. et al. (1985). "Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus." J Clin Invest 76(1): 149-155.
- Deng Y. et al. (2010). "Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome." Ann N Y Acad Sci 1212: E1-E19.
- Dennison U. et al. (2012). "Menstrual cycle influences Toll-like receptor responses." Neuroimmunomodulation 19(3): 171-179.
- Diana J. et al. (2011). "Innate immunity in type 1 diabetes." Discov Med 11(61): 513-520.
- Donath M. Y. et al. (2005). "Mechanisms of beta-cell death in type 2 diabetes." Diabetes 54 Suppl 2: S108-113.
- Dzionek A. et al. (2000). "BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood." J Immunol 165(11): 6037-6046.
- Dzionek A. et al. (2002). "Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions." Hum Immunol 63(12): 1133-1148.
- Dzionek Andrzej (2003). Humane dendritische Zellen: Identifizierung und funktionelle Charakterisierung von neuen Oberflächenantigenen [Elektronische Ressource].

- Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln. Köln, Universität zu Köln: 122.
- Dzopalic T. et al. (2012). "The response of human dendritic cells to co-ligation of pattern-recognition receptors." Immunol Res 52(1-2): 20-33.
- Eckel R. H. et al. (2005). "The metabolic syndrome." Lancet 365(9468): 1415-1428.
- Ehehalt S. et al. (2008). "Continuous rise in incidence of childhood Type 1 diabetes in Germany." Diabet Med 25(6): 755-757.
- Eiselein L. et al. (2004). "The challenge of type 1 diabetes mellitus." ILAR J 45(3): 231-236.
- Eisenbarth G. S. et al. (2008). "The natural history of type 1A diabetes." Arq Bras Endocrinol Metabol 52(2): 146-155.
- Federation International Diabetes. (2009). "Epidemiology and Prevention; Global Burden: Prevalence and Projections, 2010 and 2030." from <http://www.idf.org>.
- Fernandez-Real J. M. et al. (2012). "Innate immunity, insulin resistance and type 2 diabetes." Diabetologia 55(2): 273-278.
- Ferrannini E. et al. (2005). "beta-Cell function in subjects spanning the range from normal glucose tolerance to overt diabetes: a new analysis." J Clin Endocrinol Metab 90(1): 493-500.
- Ferrannini E. et al. (2007). "Association of fasting glucagon and proinsulin concentrations with insulin resistance." Diabetologia 50(11): 2342-2347.
- Field Andy, Ed. (2009). Discovering Statistics Using SPSS. London, SAGE Publications Ltd.
- Gelsinger C. et al. (2010). "[Adipokine update - new molecules, new functions]." Wien Med Wochenschr 160(15-16): 377-390.
- Gill Michelle A. et al. (2002). "Blood dendritic cells and DC-poietins in systemic lupus erythematosus." Human Immunology 63(12): 1172-1180.
- Greten Heiner, Ed. (2005). Innere Medizin. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Groop L. C. et al. (1989). "Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Evidence for multiple sites of insulin resistance." J Clin Invest 84(1): 205-213.
- Haase Claus et al. (2005). "Immunomodulatory dendritic cells require autologous serum to circumvent nonspecific immunosuppressive activity in vivo." Blood 106(13): 4225-4233.
- Haataja L. et al. (2008). "Islet amyloid in type 2 diabetes, and the toxic oligomer hypothesis." Endocr Rev 29(3): 303-316.
- Harford K. A. et al. (2011). "Fats, inflammation and insulin resistance: insights to the role of macrophage and T-cell accumulation in adipose tissue." Proc Nutr Soc 70(4): 408-417.
- Harjutsalo Valma et al. (2005). "Cumulative Incidence of Type 1 Diabetes in 10,168 Siblings of Finnish Young-Onset Type 1 Diabetic Patients." Diabetes 54(2): 563-569.
- Hauner H. (2005). "[Epidemiology and costs of diabetes mellitus in Germany]." Dtsch Med Wochenschr 130 Suppl 2: S64-65.

- Hinkmann C. et al. (2008). "Reduced frequency of peripheral plasmacytoid dendritic cells in type 1 diabetes." Horm Metab Res 40(11): 767-771.
- Hummel S. et al. (2011). "Early determinants of type 1 diabetes: experience from the BABYDIAB and BABYDIET studies." Am J Clin Nutr.
- Hypponen E. (2010). "Vitamin D and increasing incidence of type 1 diabetes-evidence for an association?" Diabetes Obes Metab 12(9): 737-743.
- Hyttinen Valma et al. (2003). "Genetic Liability of Type 1 Diabetes and the Onset Age Among 22,650 Young Finnish Twin Pairs." Diabetes 52(4): 1052-1055.
- Ito T. et al. (2001). "Differential regulation of human blood dendritic cell subsets by IFNs." J Immunol 166(5): 2961-2969.
- Iwasaki A. et al. (2004). "Toll-like receptor control of the adaptive immune responses." Nat Immunol 5(10): 987-995.
- Jaïdane H. et al. (2009). "Coxsackievirus B4 and type 1 diabetes pathogenesis: contribution of animal models." Diabetes/Metabolism Research and Reviews 25(7): 591-603.
- Jenson A. B. et al. (1980). "Pancreatic islet-cell damage in children with fatal viral infections." Lancet 2(8190): 354-358.
- Jongbloed S. L. et al. (2006). "Enumeration and phenotypical analysis of distinct dendritic cell subsets in psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis." Arthritis Res Ther 8(1): R15.
- Kassianos A. J. et al. (2012). "Human CD1c (BDCA-1)+ myeloid dendritic cells secrete IL-10 and display an immuno-regulatory phenotype and function in response to Escherichia coli." Eur J Immunol 42(6): 1512-1522.
- Kawai T. et al. (2006). "TLR signaling." Cell Death Differ 13(5): 816-825.
- Kerner W. et al. (2005, 12/2005). "Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus." from http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/redaktion/mitteilungen/leitlinien/PL_DD2009_Klassifikation.pdf.
- Kikkert R. et al. (2008). "Cytokine induction by pyrogens: comparison of whole blood, mononuclear cells, and TLR-transfectants." J Immunol Methods 336(1): 45-55.
- Knowler W. C. et al. (2009). "10-year follow-up of diabetes incidence and weight loss in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study." Lancet 374(9702): 1677-1686.
- Kohn L. D. et al. (2005). "Is type 2 diabetes an autoimmune-inflammatory disorder of the innate immune system?" Endocrinology 146(10): 4189-4191.
- Koppel E. A. et al. (2005). "Distinct functions of DC-SIGN and its homologues L-SIGN (DC-SIGNR) and mSIGNR1 in pathogen recognition and immune regulation." Cellular Microbiology 7(2): 157-165.
- Kvistborg P. et al. (2009). "Fast generation of dendritic cells." Cellular Immunology 260(1): 56-62.
- Langerhans Paul (1868). "Ueber die Nerven der menschlichen Haut." Virchows Archiv 44(2): 325-337.
- Lee K. U. et al. (1988). "Evidence for initial involvement of macrophage in development of insulinitis in NOD mice." Diabetes 37(7): 989-991.

- Leinonen E. et al. (2003). "Insulin resistance and adiposity correlate with acute-phase reaction and soluble cell adhesion molecules in type 2 diabetes." Atherosclerosis 166(2): 387-394.
- Leiter E. H. et al. (1987). "The non-obese diabetic (NOD) mouse." Am J Pathol 128(2): 380-383.
- Li Q. et al. (2008). "Interferon-alpha initiates type 1 diabetes in nonobese diabetic mice." Proc Natl Acad Sci U S A 105(34): 12439-12444.
- Li Qing et al. (2011). "The role of interferon alpha in initiation of type I diabetes in the NOD mouse." Clinical Immunology 140(1): 3-7.
- Lindstrom J. et al. (2006). "Sustained reduction in the incidence of type 2 diabetes by lifestyle intervention: follow-up of the Finnish Diabetes Prevention Study." Lancet 368(9548): 1673-1679.
- Lleo Ana et al. (2010). "Definition of human autoimmunity -- autoantibodies versus autoimmune disease." Autoimmunity Reviews 9(5): A259-A266.
- Loos R. J. et al. (2008). "Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity." Nat Genet 40(6): 768-775.
- Lucas M. et al. (2007). "Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15." Immunity 26(4): 503-517.
- MacPherson G. G. et al. (1995). "Endotoxin-mediated dendritic cell release from the intestine. Characterization of released dendritic cells and TNF dependence." J Immunol 154(3): 1317-1322.
- Makino S. et al. (1980). "Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice." Jikken Dobutsu 29(1): 1-13.
- Maldonado R. A. et al. (2010). "How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells." Adv Immunol 108: 111-165.
- Martin Michael
- Resch, Klaus, Ed. (2009). Immunologie. UTB basics. Stuttgart, Verlag Eugen Ulmer.
- Martin S. et al. (2003). "Evidenzbasierte Leitlinie der DDG - Therapie des Diabetes mellitus Typ 1." from http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/redaktion/mitteilungen/leitlinien/EBL_Dm_Typ1_Update_2007.pdf.
- Martin S. et al. (2007). "Behandlung des Diabetes mellitus Typ 1." from <http://www.uni-duesseldorf.de/AWMF/II/057-013k.pdf>.
- Matta Benjamin M. et al. (2010). "Tolerogenic plasmacytoid DC." European Journal of Immunology 40(10): 2667-2676.
- Matthaei S. et al. (2009). "Medical antihyperglycaemic treatment of type 2 diabetes mellitus: update of the evidence-based guideline of the German Diabetes Association." Exp Clin Endocrinol Diabetes 117(9): 522-557.
- McKernan D. P. et al. (2011). "Enhanced peripheral toll-like receptor responses in psychosis: further evidence of a pro-inflammatory phenotype." Transl Psychiatry 1: e36.
- Medzhitov R. (2008). "Origin and physiological roles of inflammation." Nature 454(7203): 428-435.

- Medzhitov Ruslan et al. (1997). "A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity." Nature 388(6640): 394-397.
- Melief C. J. (2003). "Mini-review: Regulation of cytotoxic T lymphocyte responses by dendritic cells: peaceful coexistence of cross-priming and direct priming?" Eur J Immunol 33(10): 2645-2654.
- Mellánby R. J. et al. (2009). "Role of regulatory T-cells in autoimmunity." Clin Sci (Lond) 116(8): 639-649.
- Mogensen T. H. (2009). "Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses." Clin Microbiol Rev 22(2): 240-273, Table of Contents.
- Mottonen M. et al. (1998). "Interleukin-10 inhibits the capacity of synovial macrophages to function as antigen-presenting cells." Br J Rheumatol 37(11): 1207-1214.
- Munoz-Suano A. et al. (2011). "Gimme shelter: the immune system during pregnancy." Immunol Rev 241(1): 20-38.
- Murphy K. et al., Eds. (2009). Janeway Immunologie. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Neu A. et al. (2001). "Rising incidence of type 1 diabetes in Germany: 12-year trend analysis in children 0-14 years of age." Diabetes Care 24(4): 785-786.
- Nguyen M. T. et al. (2007). "A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways." J Biol Chem 282(48): 35279-35292.
- Nuboer R. et al. (2008). "Effects of insulin pump vs. injection treatment on quality of life and impact of disease in children with type 1 diabetes mellitus in a randomized, prospective comparison." Pediatr Diabetes 9(4 Pt 1): 291-296.
- Nusslein-Volhard Christiane et al. (1980). "Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila." Nature 287(5785): 795-801.
- Onkamo P. et al. (1999). "Worldwide increase in incidence of Type I diabetes--the analysis of the data on published incidence trends." Diabetologia 42(12): 1395-1403.
- Patsouris D. et al. (2008). "Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals." Cell Metab 8(4): 301-309.
- Patti M. E. et al. (2010). "The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes." Endocr Rev 31(3): 364-395.
- Pessin J. E. et al. (2000). "Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance." J Clin Invest 106(2): 165-169.
- Pfutzner A. et al. (2004). "Fasting intact proinsulin is a highly specific predictor of insulin resistance in type 2 diabetes." Diabetes Care 27(3): 682-687.
- Pham M. N. et al. (2011). "Pro- and anti-inflammatory cytokines in latent autoimmune diabetes in adults, type 1 and type 2 diabetes patients: Action LADA 4." Diabetologia 54(7): 1630-1638.
- Pickup J. C. et al. (1997a). "NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X." Diabetologia 40(11): 1286-1292.
- Pickup John et al., Eds. (1997b). Textbook of Diabetes. Oxford, Blackwell Sciences.

- Poligone Brian et al. (2002). "Elevated NF- κ B Activation in Nonobese Diabetic Mouse Dendritic Cells Results in Enhanced APC Function." The Journal of Immunology 168(1): 188-196.
- Porstmann T. et al. (1992). "Enzyme immunoassay techniques an overview." Journal of Immunological Methods 150(1-2): 5-21.
- Rathmann W. et al. (2003). "High prevalence of undiagnosed diabetes mellitus in Southern Germany: target populations for efficient screening. The KORA survey 2000." Diabetologia 46(2): 182-189.
- Reid D. C. D. L. (1997). "THE DENDRITIC CELL LINEAGE IN HAEMOPOIESIS." British Journal of Haematology 96(2): 217-223.
- Ritzel R. A. et al. (2007). "Human islet amyloid polypeptide oligomers disrupt cell coupling, induce apoptosis, and impair insulin secretion in isolated human islets." Diabetes 56(1): 65-71.
- Rodriguez-Moran M. et al. (1999). "Increased levels of C-reactive protein in noncontrolled type II diabetic subjects." J Diabetes Complications 13(4): 211-215.
- Romani N. et al. (1994). "Proliferating dendritic cell progenitors in human blood." J Exp Med 180(1): 83-93.
- Rosenbauer J. et al. (2007). "Early nutrition and risk of Type 1 diabetes mellitus--a nationwide case-control study in preschool children." Exp Clin Endocrinol Diabetes 115(8): 502-508.
- Rosenberg S. R. et al. (2012). "Biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease." Transl Res 159(4): 228-237.
- Saisho Y. et al. (2007). "Pancreas volumes in humans from birth to age one hundred taking into account sex, obesity, and presence of type-2 diabetes." Clin Anat 20(8): 933-942.
- Samuel V. T. et al. (2010). "Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism." Lancet 375(9733): 2267-2277.
- Sato K. et al. (2007). "Dendritic cells: nature and classification." Allergol Int 56(3): 183-191.
- Saxena R. et al. (2010). "Genetic variation in GIPR influences the glucose and insulin responses to an oral glucose challenge." Nat Genet 42(2): 142-148.
- Saxena V. et al. (2007). "The countervailing actions of myeloid and plasmacytoid dendritic cells control autoimmune diabetes in the nonobese diabetic mouse." J Immunol 179(8): 5041-5053.
- Scherbaum W. A. et al. (2004). "Epidemiologie und Verlauf des Diabetes mellitus in Deutschland." Evidenzbasierte Leitlinie DDG, from http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/leitlinien/EBL_Epidemiologie_Update_2004.pdf.
- Schutysse E. et al. (2005). "Involvement of CC chemokine ligand 18 (CCL18) in normal and pathological processes." J Leukoc Biol 78(1): 14-26.
- Seifarth C. C. et al. (2008). "Reduced frequency of peripheral dendritic cells in type 2 diabetes." Exp Clin Endocrinol Diabetes 116(3): 162-166.
- Seissler J. et al. (2006). "Autoimmune diagnostics in diabetes mellitus." Clin Chem Lab Med 44(2): 133-137.

- Serreze D. V. et al. (2011). "Loss of intra-islet CD20 expression may complicate efficacy of B-cell-directed type 1 diabetes therapies." Diabetes 60(11): 2914-2921.
- Shi H. et al. (2004). "Suppressor of cytokine signaling 3 is a physiological regulator of adipocyte insulin signaling." J Biol Chem 279(33): 34733-34740.
- Spranger J. et al. (2003). "Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study." Diabetes 52(3): 812-817.
- Steck A. K. et al. (2011). "Genetics of type 1 diabetes." Clin Chem 57(2): 176-185.
- Steinman R. M. (2007). "Dendritic cells: understanding immunogenicity." Eur J Immunol 37 Suppl 1: S53-60.
- Steinman R. M. et al. (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." J Exp Med 137(5): 1142-1162.
- Steinman R. M. et al. (2003). "Tolerogenic dendritic cells." Annu Rev Immunol 21: 685-711.
- Stephens Raymond J. et al. (2002). "Increased Generation of Dendritic Cells from Myeloid Progenitors in Autoimmune-Prone Nonobese Diabetic Mice." The Journal of Immunology 168(10): 5032-5041.
- Stockwin Luke H. et al. (2000). "Dendritic cells: Immunological sentinels with a central role in health and disease." Immunol Cell Biol 78(2): 91-102.
- Summers K. L. et al. (2006). "Reduced IFN- α secretion by blood dendritic cells in human diabetes." Clin Immunol 121(1): 81-89.
- Tan Jonathan K. H. et al. (2005). "Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity." Journal of Leukocyte Biology 78(2): 319-324.
- Tang Q. et al. (2008). "The Foxp3⁺ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation." Nat Immunol 9(3): 239-244.
- Tarte K. et al. (2000). "Extensive characterization of dendritic cells generated in serum-free conditions: regulation of soluble antigen uptake, apoptotic tumor cell phagocytosis, chemotaxis and T cell activation during maturation in vitro." Leukemia 14(12): 2182-2192.
- Thomas R. et al. (1999). "Dendritic cells and the pathogenesis of rheumatoid arthritis." J Leukoc Biol 66(2): 286-292.
- Tripmacher Robert (2005). Untersuchungen zu Wirkungen einer eingeschränkten Energiesynthese auf Funktionen von humanen Immunzellen Humboldt-Universität zu Berlin, Medizinische Fakultät - Universitätsklinikum Charité Berlin, Humboldt-Universität, Medizinische Fakultät - Universitätsklinikum Charité Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.): 117.
- Turley S. et al. (2003). "Physiological beta cell death triggers priming of self-reactive T cells by dendritic cells in a type-1 diabetes model." J Exp Med 198(10): 1527-1537.
- van der Linden M. W. et al. (1998). "Determination of tumour necrosis factor- α and interleukin-10 production in a whole blood stimulation system: assessment of laboratory error and individual variation." J Immunol Methods 218(1-2): 63-71.
- van der Werf N. et al. (2007). "Viral infections as potential triggers of type 1 diabetes." Diabetes/Metabolism Research and Reviews 23(3): 169-183.

- van Dieren S. et al. (2010). "The global burden of diabetes and its complications: an emerging pandemic." Eur J Cardiovasc Prev Rehabil 17 Suppl 1: S3-8.
- van Lieshout A. W. et al. (2009). "Enhanced interleukin-10 production by dendritic cells upon stimulation with Toll-like receptor 4 agonists in systemic sclerosis that is possibly implicated in CCL18 secretion." Scand J Rheumatol 38(4): 282-290.
- Vogelsang P. et al. (2010). "Levels of plasmacytoid dendritic cells and type-2 myeloid dendritic cells are reduced in peripheral blood of patients with primary Sjogren's syndrome." Ann Rheum Dis 69(6): 1235-1238.
- Voight B. F. et al. (2010). "Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis." Nat Genet 42(7): 579-589.
- von Herrath M. (2009). "Can we learn from viruses how to prevent type 1 diabetes?: the role of viral infections in the pathogenesis of type 1 diabetes and the development of novel combination therapies." Diabetes 58(1): 2-11.
- von Herrath M. G. et al. (2003). "Microorganisms and autoimmunity: making the barren field fertile?" Nat Rev Microbiol 1(2): 151-157.
- Vuckovic S. et al. (2007). "Decreased blood dendritic cell counts in type 1 diabetic children." Clin Immunol 123(3): 281-288.
- Welzen-Coppens J. M. et al. (2011). "Abnormalities of dendritic cell precursors in the pancreas of the NOD mouse model of diabetes." Eur J Immunol.
- WHO. (2010). "Defining Diabetes." from <http://www.who.int/diabetesactiononline/diabetes/basics/en/index1.html>.
- Williams K. V. et al. (2003). "Weight loss-induced plasticity of glucose transport and phosphorylation in the insulin resistance of obesity and type 2 diabetes." Diabetes 52(7): 1619-1626.
- Winter W. E. et al. (2011). "Autoimmune markers in diabetes." Clin Chem 57(2): 168-175.
- Yan Z. et al. (2010). "Redox remodeling as an immunoregulatory strategy." Biochemistry 49(6): 1059-1066.
- Zak D. E. et al. (2009). "Systems biology of innate immunity." Immunol Rev 227(1): 264-282.
- Zeggini E. et al. (2008). "Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes." Nat Genet 40(5): 638-645.
- Ziegler A. G. et al. (2003). "Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes-associated autoantibodies." JAMA 290(13): 1721-1728.

8 Danksagung

In erster Linie möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. J. Seißler für die Überlassung dieses Themas und die Unterstützung beim Erforschen, Verstehen und in Worte fassen des Diabetes und der Immunologie bedanken. Insbesondere die menschliche Seite der Medizin und Forschungsarbeit zu erfahren war eine Bereicherung.

Vielen herzlichen Dank möchte ich auch Frau Monika Offers, Miriam Nath und Dr. rer. nat. C. Sattler aussprechen, die mich in die hohe Kunst der Laborarbeit mit all ihren Tücken geduldig einlerten, immer hilfsbereit waren und dabei auch den Spaß nie aus den Augen verloren.

Weiterhin möchte ich mich beim restlichen Diabetesteam, allen voran Kati Aimer, Christine Grünfeld, und den Rosis (Lohr und Küfner), sowie der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. F. Beuschlein und Dr. M. Bidlingmaier, insbesondere bei Rita, Juliane und Brigitte, sowie der Arbeitsgruppe Prof. Endres bedanken, dass ich ihre Messgeräte und Hilfe in Anspruch nehmen durfte.

Danke auch an all meine Mitdoktoranden, vor allem für die seelische und leibliche Unterstützung und an alle, die für diese Studie Blut gespendet haben und/oder mir geholfen haben passende Spender zu finden, denn ohne sie wäre diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen!

Nearly last, but not least möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern bedanken, die mir die Begeisterung für die Medizin von Anfang an Nahe brachten und mir zeigten, dass es nicht „nur“ ein Beruf ist. Ohne ihre liebevolle Unterstützung und Ermutigung wäre das alles nicht möglich gewesen. Vielen Dank ebenfalls an meine großen Geschwister, die immer für mich da sind, sich jedes Problem anhören und für fast jedes eine Lösung haben.

Und zum Schluss noch tausend Dank an Alex. Für alles, was Du für mich getan hast und was Du bist. Dass Du immer für mich da bist und an mich glaubst.

Anhang

Anhang A

ELISA-Reagenzien

Arbeitskonzentrationen der ELISA –Reagenzien

Streptavidin-HRP	1/200 verdünnen, d.h. pro Well 0,5 µl Streptavidin in 99,5 µl RD lösen
Capture Antibody (CAb)	Lösen in PBS (pH 7.2 - 7.4) pro Well 0,55 µl CAb gelöst in 99,45 µl PBS
Detection Antibody (DAb)	Lösen in RD pro Well 0,55 µl DAb gelöst in 99,45 µl RD
Waschpuffer	0,05 % Tween 20 gelöst in PBS, pH 7.2-7.4
Reagent Diluent (RD)	1 % BSA fraction V gelöst in PBS, pH 7.2-7.4; steril filtriert

Stand März 2007

Zusätzliche Studieninformation für die Abnahme von Heparinblut

Studie zur Bedeutung metabolischer, inflammatorischer und genetischer Marker bei Patienten mit Diabetes mellitus und/oder metabolischem Syndrom

Der Diabetes mellitus Typ 1 ist eine Autoimmunerkrankung. Der Körper erkennt die insulin-produzierenden Zellen in der Bauchspeicheldrüse (Betazellen) nicht mehr als sein eigenes Gewebe, sondern betrachtet es als fremd (als Antigen). Deshalb greift das Immunsystem die Zellen an und zerstört sie. Durch den Verlust der Betazellen kann der Körper das Insulin nicht mehr produzieren. Insulin ist wichtig, um Glukose (Zucker) aus dem Blut in die Zellen zu befördern und den Zellstoffwechsel aufrecht zu erhalten.

Dieser Teil der Studie beschäftigt sich mit der Rolle der so genannten dendritischen Zellen im Rahmen des Typ 1 Diabetes im ersten Jahr der Erkrankung. Dendritische Zellen nehmen Antigene auf und präsentieren diese bestimmten Abwehrzellen (T-Zellen) des Immunsystems, die an der Zerstörung der Betazellen beteiligt sind. Es stellt sich die Frage wie die DCs die Autoimmunreaktion in Gang setzten und ob die Aktivität der DCs bei Patienten mit einem Typ 1 Diabetes verändert ist. Diese Fragen sollen durch die vorliegende Studie beantwortet werden.

Wir hoffen durch diese Studie die Rolle der DCs bei der Entstehung eines Typ 1 Diabetes besser als bisher zu verstehen. Hierdurch könnte es in Zukunft möglich werden die Erkrankung besser als bisher zu vorhersagen und auch früher behandeln zu können. Eventuell findet sich dadurch sogar eine Möglichkeit den Typ 1 Diabetes zu verhindern.

Mit Ihrer Blutspende können Sie dazu beitragen wichtige neue Daten zur Entwicklung des Typ 1 Diabetes zu gewinnen.

Wir danken Ihnen für Ihre Mithilfe!

Prof. Dr. med. J. Seißler

Cand. med. Christina Ritz

Anhang B

Kruskal-Wallis-Tests

Übersicht der ELISA-Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests (Tage im Gruppenvergleich)

	FSL1 D1 IL-6	FSL1 D2 IL-6	FSL1 D3 IL-6	FSL1 D4 IL-6	FSL1 D5 IL-6
H(3)	3,773	5,752	1,697	4,783	2,804
p =	,293	,122	,653	,191	,436
	PIC D1 IL-6	PIC D2 IL-6	PIC D3 IL-6	PIC D4 IL-6	PIC D5 IL-6
H(3)	,429	2,743	1,514	1,716	6,166
p =	,940	,442	,695	,649	,099
	LPS D1 IL-6	LPS D2 IL-6	LPS D3 IL-6	LPS D4 IL-6	LPS D5 IL-6
H(3)	1,067	3,949	2,144	2,698	2,137
p =	,795	,270	,559	,452	,562
	Flagellin D1 IL-6	Flagellin D2 IL-6	Flagellin D3 IL-6	Flagellin D4 IL-6	Flagellin D5 IL-6
H(3)	1,504	5,243	5,870	3,169	2,692
p =	,693	,159	,119	,379	,457
	CL097 D1 IL-6	CL097 D2 IL-6	CL097 D3 IL-6	CL097 D4 IL-6	CL097 D5 IL-6
H(3)	1,322	2,137	1,859	4,692	,491
p =	,739	,554	,615	,195	,923
	RPMI D1 IL-6	RPMI D2 IL-6	RPMI D3 IL-6	RPMI D4 IL-6	RPMI D5 IL-6
H(3)	7,785	4,680	4,100	5,879	5,704
p =	,043	,198	,255	,114	,124
	FSL1 D1 IL-12p70	FSL1 D2 IL-12p70	FSL1 D3 IL-12p70	FSL1 D4 IL-12p70	FSL1 D5 IL-12p70
H(3)	2,821	1,008	,502	2,499	,653
p =	,437	,812	,923	,498	,894
	PIC D1 IL-12p70	PIC D2 IL-12p70	PIC D3 IL-12p70	PIC D4 IL-12p70	PIC D5 IL-12p70
H(3)	1,824	3,721	2,723	,559	1,529
p =	,631	,306	,456	,919	,696
	LPS D1	LPS D2	LPS D3	LPS D4	LPS D5

	IL-12p70	IL-12p70	IL-12p70	IL-12p70	IL-12p70
H(3)	2,267	4,392	2,752	2,066	1,399
p =	,533	,226	,446	,576	,722
	Flagellin D1 IL-12p70	Flagellin D2 IL-12p70	Flagellin D3 IL-12p70	Flagellin D4 IL-12p70	Flagellin D5 IL-12p70
H(3)	,261	,745	1,091	,661	,190
p =	,967	,866	,784	,886	,977
	CL097 D1 IL-12p70	CL097 D2 IL-12p70	CL097 D3 IL-12p70	CL097 D4 IL-12p70	CL097 D5 IL-12p70
H(3)	,789	1,735	,852	,271	,462
p =	,852	,629	,837	,965	,927
	RPMI D1 IL-12p70	RPMI D2 IL-12p70	RPMI D3 IL-12p70	RPMI D4 IL-12p70	RPMI D5 IL-12p70
H(3)	,857	1,628	1,589	1,519	,811
p =	,836	,653	,662	,678	,847
	FSL1 D1 TNFa	FSL1 D2 TNFa	FSL1 D3 TNFa	FSL1 D4 TNFa	FSL1 D5 TNFa
H(3)	8,565	2,736	1,629	,552	1,175
p =	,036	,434	,653	,907	,759
	PIC D1 TNFa	PIC D2 TNFa	PIC D3 TNFa	PIC D4 TNFa	PIC D5 TNFa
H(3)	1,072	1,416	,250	,666	,641
p =	,784	,702	,969	,881	,887
	LPS D1 TNFa	LPS D2 TNFa	LPS D3 TNFa	LPS D4 TNFa	LPS D5 TNFa
H(3)	3,258	1,881	,088	1,492	1,447
p =	,354	,598	,993	,684	,695
	Flagellin D1 TNFa	Flagellin D2 TNFa	Flagellin D3 TNFa	Flagellin D4 TNFa	Flagellin D5 TNFa
H(3)	,853	3,816	,651	1,438	,326
p =	,837	,282	,885	,697	,955
	CL097 D1 TNFa	CL097 D2 TNFa	CL097 D3 TNFa	CL097 D4 TNFa	CL097 D5 TNFa
H(3)	1,916	3,933	6,883	9,638	3,886
p =	,590	,269	,076	,022	,274

	RPMI D1 TNFa	RPMI D2 TNFa	RPMI D3 TNFa	RPMI D4 TNFa	RPMI D5 TNFa
H(3)	1,555	,699	,696	2,513	5,357
p =	,670	,873	,874	,473	,147
	FSL1 D1 CCL-18	FSL1 D2 CCL-18	FSL1 D3 CCL-18	FSL1 D4 CCL-18	FSL1 D5 CCL-18
H(3)	7,471	3,403	4,409	3,802	2,895
p =	,058	,334	,221	,284	,408
	PIC D1 CCL-18	PIC D2 CCL-18	PIC D3 CCL-18	PIC D4 CCL-18	PIC D5 CCL-18
H(3)	2,832	2,644	2,126	1,153	1,866
p =	,418	,450	,547	,764	,601
	LPS D1 CCL-18	LPS D2 CCL-18	LPS D3 CCL-18	LPS D4 CCL-18	LPS D5 CCL-18
H(3)	2,556	3,500	2,930	1,267	2,265
p =	,465	,321	,403	,737	,519
	Flagellin D1 CCL-18	Flagellin D2 CCL-18	Flagellin D3 CCL-18	Flagellin D4 CCL-18	Flagellin D5 CCL-18
H(3)	2,590	1,977	2,600	3,263	3,705
p =	,459	,577	,458	,353	,295
	CL097 D1 CCL-18	CL097 D2 CCL-18	CL097 D3 CCL-18	CL097 D4 CCL-18	CL097 D5 CCL-18
H(3)	2,747	3,072	3,716	4,300	4,194
p =	,432	,381	,294	,231	,241
	RPMI D1 CCL-18	RPMI D2 CCL-18	RPMI D3 CCL-18	RPMI D4 CCL-18	RPMI D5 CCL-18
H(3)	3,595	2,503	2,511	1,805	,979
p =	,309	,475	,473	,614	,806
	FSL1 D1 IL-10	FSL1 D2 IL-10	FSL1 D3 IL-10	FSL1 D4 IL-10	FSL1 D5 IL-10
H(3)	1,000	,700	,078	,694	,100
p =	,607	,705	,962	,707	,951
	PIC D1 IL-10	PIC D2 IL-10	PIC D3 IL-10	PIC D4 IL-10	PIC D5 IL-10
H(3)	,611	,000	,700	,078	,244

p =	,737	1,000	,705	,962	,885
	LPS D1 IL-10	LPS D2 IL-10	LPS D3 IL-10	LPS D4 IL-10	LPS D5 IL-10
H(3)	1,276	,330	,109	,185	,185
p =	,735	,954	,991	,980	,980
	Flagellin D1 IL-10	Flagellin D2 IL-10	Flagellin D3 IL-10	Flagellin D4 IL-10	Flagellin D5 IL-10
H(3)	1,178	,278	,100	,611	,611
p =	,555	,870	,951	,737	,737
	CL097 D1 IL-10	CL097 D2 IL-10	CL097 D3 IL-10	CL097 D4 IL-10	CL097 D5 IL-10
H(3)	2,211	2,411	,100	,778	,611
p =	,331	,300	,951	,678	,737
	RPMI D1 IL-10	RPMI D2 IL-10	RPMI D3 IL-10	RPMI D4 IL-10	RPMI D5 IL-10
H(3)	,185	,436	,048	,136	,000
p =	,980	,933	,997	,987	1,000

Die MDC1-Population der Typ 2 Diabetiker, $D(10) = 0.18$, und der Gestationsdiabetikerinnen, $D(3) = 0.91$, sowie der PDC-Population der Typ 1 Diabetiker, $D(6) = 0.24$ zeigten eine Normalverteilung mit $p > 0.05$. Die Gruppengesamtheit jedoch war für alle drei DC-Subpopulationen signifikant nicht normalverteilt. Es ergaben sich folgende Werte: für MDC1: $D(41) = 0.27$, $p < 0.01$; für MDC2: $D(41) = 0.29$, $p < 0.01$; für PDC: $D(41) = 0.39$, $p < 0.01$. Da die Grundgesamtheit nicht normalverteilt war, wurden alle weiteren Analysen mit nicht parametrischen Tests durchgeführt.